



TESIS DOCTORAL

**Integración de la cadena respiratoria y la
síntesis de coenzima Q, la función de *COQ4***

Elena García-Testón Páez

Directores:

Carlos Santos Ocaña

Plácido Navas Lloret

Universidad Pablo de Olavide

2014



UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, ANATOMÍA Y BIOLOGÍA
CELULAR
ÁREA DE BIOLOGÍA CELULAR

INTEGRACIÓN DE LA CADENA RESPIRATORIA Y LA
SÍNTESIS DE COENZIMA Q, LA FUNCIÓN DE COQ4

Elena García-Testón Páez

Sevilla, 2014



UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, ANATOMÍA Y
BIOLOGÍA CELULAR
ÁREA DE BIOLOGÍA CELULAR

INTEGRACIÓN DE LA CADENA RESPIRATORIA Y LA SÍNTESIS DE
COENZIMA Q, LA FUNCIÓN DE COQ4

Memoria de tesis presentada por **Elena García-Testón Páez**,
Licenciada en Biología para optar al grado de **DOCTOR**.

Los Directores

CARLOS SANTOS OCAÑA
Profesor Titular Biología Celular

PLÁCIDO NAVAS LLORET
Catedrático de Biología Celular

Sevilla, a 20 de octubre de 2014



D. CARLOS SANTOS OCAÑA, DOCTOR EN CIENCIAS POR LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA Y PROFESOR TITULAR DEL ÁREA DE BIOLOGÍA CELULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, ANATOMÍA, Y BIOLOGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

INFORMA

Que **Doña Elena García-Testón Páez**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “**Integración de la cadena respiratoria y la síntesis de coenzima Q, la función de COQ4**”, y que a su juicio reúne los méritos suficientes para optar al grado de Doctor en Ciencias.

Y para que conste, firmo el presente en Sevilla, a 20 de octubre de dos mil catorce.



D. PLÁCIDO NAVAS LLORET, DOCTOR EN CIENCIAS POR LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA Y CATEDRÁTICO DEL ÁREA DE BIOLOGÍA CELULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, ANATOMÍA, Y BIOLOGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

INFORMA

Que **Doña Elena García-Testón Páez**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “**Integración de la cadena respiratoria y la síntesis de coenzima Q, la función de COQ4**”, y que a su juicio reúne los méritos suficientes para optar al grado de Doctor en Ciencias.

Y para que conste, firmo el presente en Sevilla, a 20 de octubre de dos mil catorce.



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Área de Biología Celular del Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular de la Universidad Pablo de Olavide bajo la dirección del Dr. Carlos Santos Ocaña y el Dr. Plácido Navas Lloret. El trabajo ha sido financiado por los proyectos de investigación del FIS del ISCIII PI11/00078 y PI08500.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	15
1. El coenzima Q.....	15
1.1. Estructura y funciones del coenzima Q.....	15
1.2. Síntesis de CoQ.....	20
1.3. Síntesis de CoQ en <i>S. cerevisiae</i>	21
2. Síndrome de deficiencia de CoQ	23
2.1. Las enfermedades mitocondriales	23
2.2. La deficiencia de CoQ	25
2.2.1. Deficiencia primaria de CoQ.....	28
2.2.2. Diagnóstico y tratamiento de la deficiencia de CoQ.....	30
3. Regulación de la síntesis de CoQ en eucariotas	31
3.1. Síntesis de CoQ y metabolismo bioenergético.....	31
3.2. Síntesis de CoQ y estrés oxidativo.....	33
3.3. Evidencias de la existencia de un complejo de síntesis	36
3.3.1. Acumulación de precursores en mutantes en la síntesis de CoQ	36
3.3.2. Mantenimiento de los niveles de proteínas Coq en los mutantes en la	38
3.3.3. Estudios de sobreexpresión en la síntesis de CoQ	39
3.4. Composición del complejo de síntesis	40
3.5. Regulación mediante fosforilación.....	42
3.5.1. Fosforilación en la síntesis de CoQ.....	44
4. El gen <i>COQ4</i>	46
4.1. Características del gen <i>COQ4</i>	46
4.2. El gen <i>COQ4</i> en la deficiencia de CoQ ₁₀	47
OBJETIVOS.....	53
MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
1. Estirpes	57
2. Medios de cultivo	57
2.1. Medios de bacterias	57
2.2. Medios de levaduras	57

3.	Diseño de cebadores	58
4.	Clonación de genes en vectores de expresión	58
5.	Análisis bioinformático de secuencias de proteínas	59
6.	Purificación de ADN genómico.....	60
7.	Mutagénesis dirigida	60
8.	Secuenciación.....	60
9.	Transformación bacterias.....	60
10.	Sobreexpresión de proteínas en bacterias:.....	61
11.	Purificación de proteínas recombinantes en bacterias.....	61
12.	Sobreexpresión de proteínas recombinantes en levadura	62
13.	Cuantificación de proteínas	62
14.	Ensayo de fosforilación in vitro	62
15.	Transformación de levaduras.....	63
16.	Generación de un doble mutante <i>coq4/coq7</i> en levadura	63
17.	Purificación de esferoplastos y mitocondrias	64
18.	Ensayo de viabilidad en medio YPG e YPD	65
19.	Extracción y cuantificación de compuestos quinónicos en mitocondria de levadura	65
20.	Medida del ratio CoQ reducido/oxidado	66
21.	Medida de las actividades de la cadena respiratoria mitocondrial	67
21.1.	Actividad del complejo I (NADH-DCIP reductasa)	67
21.2.	Actividad del complejo III (decilubiquinona-citocromo c reductasa)	67
21.3.	Actividad del complejo I+III (NADH-citocromo c reductasa).....	67
22.	Consumo de oxígeno.....	68
23.	Medida de la producción de radicales libres	68
23.1.	Medida de la producción de radicales libres en células enteras	68
23.2.	Medida de la producción de superóxido en la mitocondria	69
24.	Solubilización de mitocondria de levadura	69
25.	Inmunodetección de proteínas	69
26.	Análisis de complejos de proteínas mediante electroforesis en condiciones nativas	70
27.	Tinción de plata	71
	RESULTADOS	77
1.	Análisis del complejo de síntesis de CoQ mediante estudios de sobreexpresión de los genes COQ.....	77
1.1.	Sobreexpresión de genes <i>COQ</i> en levaduras silvestres	78

1.2.	Sobreexpresión de proteínas Coq en mutantes nulos de levadura	80
1.2.1.	Sobreexpresión de genes <i>COQ</i> en un mutante nulo <i>coq3</i>	81
1.2.2.	Sobreexpresión de genes <i>COQ</i> en un mutante nulo <i>coq4</i>	82
1.2.3.	Sobreexpresión de genes <i>COQ</i> en un mutante nulo <i>coq5</i>	84
1.2.4.	Sobreexpresión de genes <i>COQ</i> en un mutante nulo <i>coq6</i>	86
1.2.5.	Sobreexpresión de genes <i>COQ</i> en un mutante nulo <i>coq8</i>	88
1.2.6.	Sobreexpresión de genes <i>COQ</i> en un mutante nulo <i>coq9</i>	89
1.2.7.	Sobreexpresión de genes <i>COQ</i> en un mutante nulo <i>coq7</i>	89
2.	Caracterización de Coq4p como una fosfoproteína.....	95
2.1.	Análisis de la secuencia de la proteína Coq4 de <i>S. cerevisiae</i> para determinar posibles sitios de fosforilación	96
2.2.	Análisis de la estructura tridimensional de la proteína Coq4 y localización de los aminoácidos seleccionados.....	98
2.3.	Caracterización <i>in vitro</i> de Coq4p como una fosfoproteína	100
2.3.1.	Obtención de versiones modificadas del gen <i>COQ4</i>	100
2.3.2.	La proteína Coq4p se fosforila <i>in vitro</i>	100
3.	Efecto de las versiones modificadas de Coq4p en la levadura <i>S. cerevisiae</i>	103
3.1.	Las versiones mutantes del gen <i>COQ4</i> no son capaces de crecer en un medio con glicerol como fuente de carbono	103
3.2.	Las versiones mutantes del gen <i>COQ4</i> no afectan a los niveles de CoQ ₆	105
3.3.	Las versiones mutantes del gen <i>COQ4</i> afectan al consumo de oxígeno.....	106
3.5.	Estado redox del coenzima Q mitocondrial en los mutantes puntuales	110
3.6.	Producción de radicales libres en las levaduras mutantes en <i>COQ4</i>	111
3.6.1.	Producción de radicales libres en células enteras	111
3.6.2.	Producción de superóxido mitocondrial	112
3.7.	Suplementación con CoQ ₆ de mutantes en genes <i>COQ</i>	113
3.8.	Incorporación de COQ ₆ en la estirpe BY4741 de <i>S. cerevisiae</i>	116
4.	Formación del complejo de síntesis en levaduras portadoras de las mutaciones en Coq4p.	118
4.1.	Niveles de expresión de proteínas Coq en levaduras portadoras de las mutaciones en Coq4p.	118
4.2.	Estudio de la formación del complejo de síntesis de CoQ mediante la sobreexpresión de Coq8p	119
4.3.	La sobreexpresión de Coq8p no rescata la respiración en las levaduras con mutaciones puntuales en <i>COQ4</i>	121

4.4. Formación del complejo de síntesis en un mutante <i>coq7</i> portando las versiones modificadas de Coq4p sobreexpresando Coq8p.....	122
5. Organización de los complejos respiratorios en los mutantes en <i>COQ4</i>	125
DISCUSIÓN.....	133
BIBLIOGRAFÍA.....	143

ABREVIATURAS

2-OPP: 2-octaprenil fenol

3,4-DHHB: 3,4-dihidroxi-5-hexaprenilbenzoato

4-HB: Ácido 4-hidroxibenzoico

ADNss: ADN de una cadena

ATP: Adenosina trifosfato

CoQ: Coenzima Q

CPT: Camptotecina

DCIP: Diclorofenol-indofenol

DHAP: Dihidroxiacetona fosfato

DMQ: 5-demetoxi coenzima Q

DDMQ: Demetil-demetoxi-coenzima Q

DTT: Ditiotreitól

ECD: Detector electroquímico

FADH₂: Forma reducida del flavina adenina dinucleótido

HAP: Complejo de unión a CCAAT activado por hemo y reprimido por glucosa.

HHB: Ácido 4-hidroxi-3-poliprenil benzoico

HOG: Alta osmolaridad en glicerol

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

LB: Medio Luria Broth

LDL: Lipoproteína de baja densidad

MEP: 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato

mtDNA: ADN mitocondrial

NAD⁺/NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada/reducida)

nDNA: ADN nuclear

PDH: Piruvato deshidrogenasa

PKC: Proteína quinasa C

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PTP: Poro de transición mitocondrial

ROS: Especies reactivas del oxígeno

UCP: Proteínas desacoplantes

UMP: Uracil monofosfato

UV: Ultravioleta

WB: *Western-blot*

RESUMEN

RESUMEN

Dentro de las enfermedades mitocondriales se encuentra la deficiencia de CoQ. Este es un síndrome asociado principalmente a cinco fenotipos: encefalomiopatía, enfermedad multisistémica infantil severa, ataxia cerebelar, miopatía aislada y síndrome nefrótico. Aunque los síntomas pueden ser muy variables y no todos los pacientes responden de la misma manera al tratamiento, algunos de ellos responden de manera positiva al ser tratados con CoQ₁₀, por lo que es una de las pocas enfermedades mitocondriales con tratamiento efectivo. Conocer la ruta de síntesis de CoQ puede ayudarnos a realizar un diagnóstico más rápido y a encontrar nuevas terapias para los pacientes con deficiencia de CoQ. Aunque no se conoce bien en humanos, la ruta de síntesis de CoQ está bien conservada por lo que podemos tener una idea de cómo funciona basándonos en la ruta de la levadura *S. cerevisiae* que sí está bien caracterizada.

En *S. cerevisiae* se conocen al menos 11 genes implicados en la síntesis de CoQ₆ (*COQ1-9*, *Arh1* y *Yah1*) (Pierrel et al., 2010; Tran and Clarke, 2007). Todo parece indicar que las proteínas que participan en este proceso se organizan formando un complejo multienzimático. En el estudio de complejos de proteínas, se utiliza con frecuencia la sobreexpresión de alguno de los componentes del complejo para suprimir mutaciones en otro de los componentes de este. En el caso de la síntesis de CoQ₆, la sobreexpresión de Coq8p ha sido utilizada con frecuencia para demostrar la existencia de un complejo de síntesis y darnos información sobre la función de algunas de las proteínas de este complejo (Ozeir et al., 2011; Padilla et al., 2009; Xie et al., 2012). En este trabajo se ha utilizado la sobreexpresión de las distintas proteínas Coq tanto en una levadura silvestre como en diferentes mutantes nulos. Los resultados obtenidos muestran que la sobreexpresión provoca distintos efectos en los niveles de CoQ₆ de estas levaduras dependiendo de la función que desempeñe cada proteína.

Una de las proteínas que interviene en la síntesis de CoQ₆ es Coq4p, cuya función es desconocida pero es indispensable para la síntesis de CoQ₆ (Belogrudov et al., 2001). Basándose en lo poco que se conoce de ella y en un modelo tridimensional de su estructura, Coq4p ha sido propuesta como proteína nucleadora del complejo de síntesis uniéndose a un intermediario isoprenoide de la síntesis y al resto de proteínas Coq (Marbois et al., 2009; Rea et al., 2010). En los últimos tiempos se han hallado mutaciones en el gen *COQ4* en pacientes con deficiencia primaria de CoQ por lo que ha aumentado el interés por conocer su función (Jimenez-Ortega, 2009; Salviati et al., 2012).

La síntesis de CoQ, como otros muchos procesos celulares, está regulada por fosforilación. Se ha demostrado que Coq7 es regulado de esta manera e incluso se ha descrito la fosfatasa implicada en su desfosforilación, Ptc7p (Martin-Montalvo et al., 2011, 2013). Además, existen otras proteínas que también son fosforiladas como Coq3p, Coq5p y Coq7p (Tauche et al., 2008) por lo que no podemos descartar que existan otras fosfoproteínas en esta ruta de síntesis. La hipótesis de partida de este trabajo es que Coq4p, debido a su posible función nucleadora es una buena candidata para ser fosforilada y regular mediante este proceso el inicio de la nucleación del complejo de la síntesis de CoQ. Para ello se llevo a cabo un estudio de su secuencia en busca de posibles sitios de fosforilación en el que se seleccionaron tres residuos conservados que se localizaban en la misma región de la superficie de la proteína. Un ensayo de fosforilación *in vitro* de la proteína demostró que esta era capaz de ser fosforilada por una PKC mientras que la sustitución de estos tres aminoácidos por alanina, un aminoácido que no puede ser fosforilado, llevó a una disminución de la fosforilación de la proteína.

Para comprobar el efecto de estas mutaciones *in vivo*, se utilizaron levaduras portadoras de estas versiones modificadas de Coq4p y se analizaron distintos parámetros fisiológicos como crecimiento en un medio con glicerol como fuente de carbono, niveles de CoQ₆, consumo de oxígeno, medida de las actividades de la cadena respiratoria, etc. Según los resultados, se observó que estas levaduras poseían niveles normales de CoQ₆ pero eran incapaces de respirar debido a una deficiencia en la

actividad del complejo III causada por las mutaciones en Coq4p. Además, al comparar estos mutantes con otros mutantes puntuales en *COQ4* anteriormente descritos (Belogrudov et al., 2001; Marbois et al., 2009) se determinó que existen dos tipos de mutantes en Coq4p asociados a dos funciones distintas de la proteína, por un lado, Coq4p participa en la síntesis de CoQ₆ siendo necesaria como nucleadora para la formación del complejo de síntesis. Por otro lado, Coq4p es indispensable para el funcionamiento del complejo III. Por ello podemos considerar a Coq4p como una proteína con una doble función que actúa como punto de control integrando la síntesis de CoQ₆ con el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. El coenzima Q

1.1. Estructura y funciones del coenzima Q

El coenzima Q o ubiquinona (CoQ) es una molécula de naturaleza lipídica que fue caracterizada en la década de los 50 (Crane et al., 1957; Festenstein et al., 1955). Está formada por un anillo benzoquinónico hidroxilado, el cual le confiere su capacidad redox, unido en posición 3 a una cola poliisoprenoide de longitud variable. La cola isoprenoide es la responsable de que el CoQ pueda anclarse a las membranas. El número de unidades de isopreno que contiene depende de la especie, siendo 6 unidades en la levadura *S. cerevisiae* (CoQ₆), 8 en *E. coli* (CoQ₈) y 10 en humanos (CoQ₁₀). Algunas especies contienen distintas formas de CoQ como es el caso de *Mus musculus* que posee tanto CoQ₉ como CoQ₁₀.

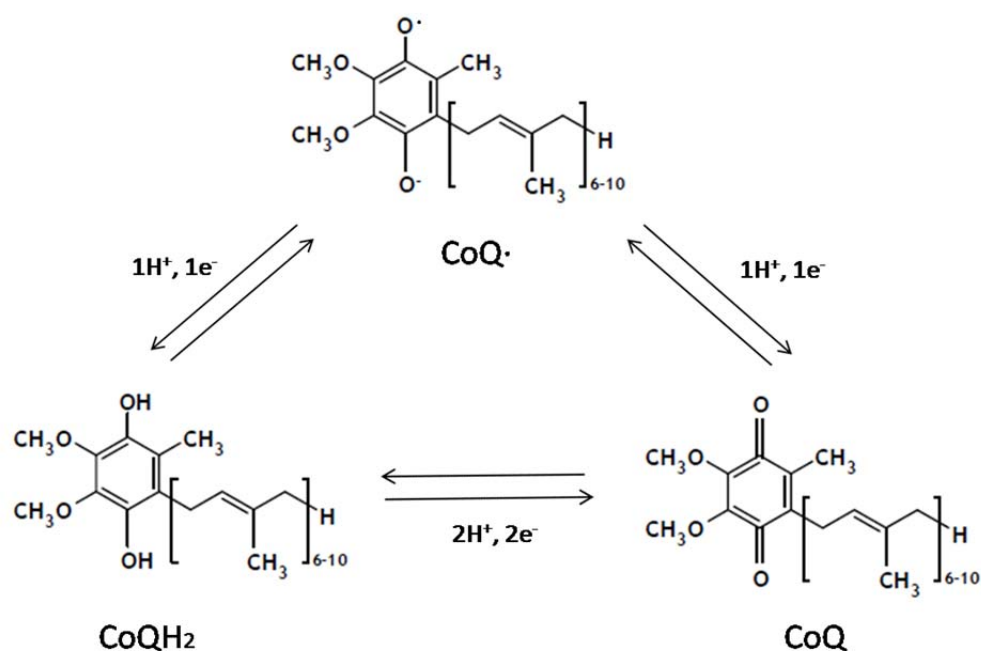


Figura 1. Estados de oxidación-reducción del CoQ. La ubiquinona (CoQ) puede reducirse a ubiquinol (CoQH₂) tomando dos protones y dos electrones. Existe un estado intermedio redox llamado semiquinona (CoQ•).

El CoQ puede encontrarse en tres estados diferentes de óxido-reducción (Figura 1). La forma oxidada se denomina ubiquinona mientras que la forma reducida se denomina ubiquinol. Existe también un estado intermedio de oxidación llamado semiquinona. Es así, mediante ciclos de oxidación-reducción, como el CoQ actúa como transportador de electrones (Crane et al., 1957).

La función más conocida del CoQ en la célula es la del transporte de electrones desde el complejo I y II hasta el complejo III en la cadena respiratoria mitocondrial. La cadena de transporte de electrones comienza cuando el complejo I toma dos electrones del NADH y los cede a una molécula de CoQ reduciéndola. En esta reducción el CoQ toma dos H^+ de la matriz y la energía liberada por la transferencia de electrones permite el paso de cuatro H^+ desde la matriz al espacio intermembrana en el complejo I. Por otro lado, el succinato, vía $FADH_2$, puede ceder dos electrones al complejo II y reducir una molécula de CoQ, que a su vez toma dos H^+ de la matriz. El complejo II no produce translocación de protones al espacio intermembrana. El complejo III transfiere los electrones desde el $CoQH_2$ hasta el citocromo *c*. Por cada molécula de $CoQH_2$ se reducen dos moléculas de citocromo *c* y dos protones son translocados al espacio intermembrana. Al oxidarse, el ubiquinol libera otros dos protones al espacio intermembrana, por lo que por cada molécula de ubiquinol que llega al complejo III, son translocados cuatro H^+ . El paso de electrones desde el $CoQH_2$ hasta el complejo III se produce mediante el llamado ciclo del CoQ (Cramer et al., 2011). Por último, el complejo IV oxida el citocromo *c* para reducir oxígeno molecular. Son necesarias cuatro moléculas de citocromo *c* y dos protones de la matriz para obtener dos moléculas de agua. Además se produce la translocación de cuatro H^+ más al espacio intermembrana. Durante la transferencia de electrones se genera un gradiente de protones entre ambos lados de la membrana interna. Dado que la membrana es impermeable al paso de protones, estos pasan a la matriz a través de la ATP sintetasa (complejo V), que utiliza la energía que se libera para generar ATP a partir de ADP. Todo este proceso es lo que se conoce como fosforilación oxidativa (Figura 2).

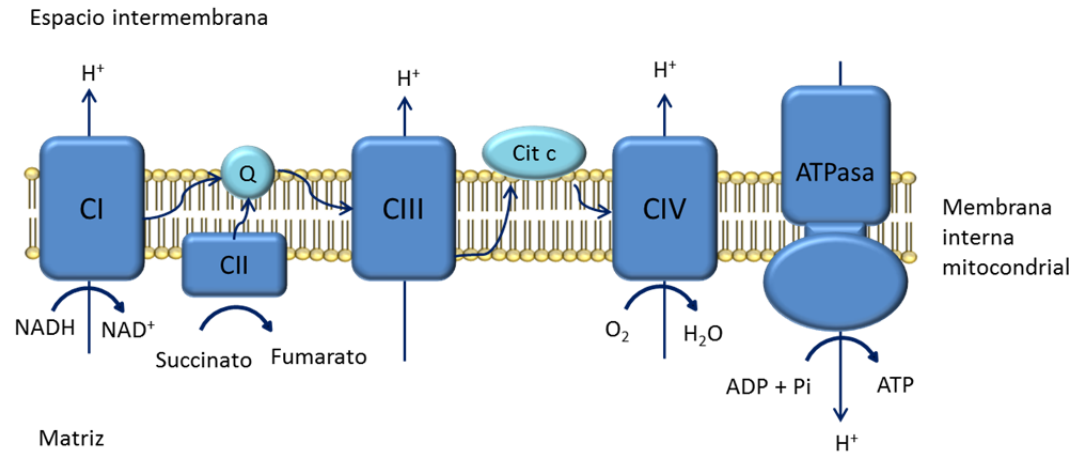


Figura 2. Cadena de transporte de electrones mitocondrial. El CoQ es el encargado del transporte de electrones desde los complejos I y II al complejo III. Desde el complejo III pasan al citocromo c y de ahí al complejo IV. Este transporte de electrones lleva acoplado el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, produciéndose un gradiente a ambos lados de la membrana. Gracias a este gradiente los protones vuelven a la matriz a través de la ATPasa que a su vez utiliza la energía procedente del paso de los protones para generar ATP a partir de ADP.

El CoQ participa en el sistema redox de la membrana plasmática. En la cara interna de la membrana plasmática existe una transferencia de electrones gracias a la presencia de dos CoQ-reductasas, la citocromo b_5 reductasa y NQO1, que catalizan la reducción del CoQ en presencia de NAD(P)H (Villalba et al., 1995). Este sistema está implicado en la regulación del ratio citosólico $NAD(P)^+/NAD(P)H$ en levadura (Jiménez-Hidalgo et al., 2009), la reducción del ascorbato extracelular (Arroyo et al., 2004; Santos-Ocaña et al., 1995, 1998), la regeneración de antioxidantes como la vitamina E (inserta en la membrana plasmática) (Kagan et al., 1998) y la vitamina C (en la superficie celular) (Gómez-Díaz et al., 1997) y parece intervenir en el control del crecimiento y la diferenciación celular (Gómez-Díaz et al., 1997). También hay indicios de la existencia de una CoQ-reductasa dependiente de NADH implicada en la translocación de protones en el lisosoma (Gille and Nohl, 2000).

El CoQ es el único antioxidante de naturaleza lipídica sintetizado endógenamente (Bentinger et al., 2007). Es capaz de evitar la oxidación de las proteínas y del ADN, y la peroxidación lipídica de las membranas celulares (Do et al., 1996). Inhibe la

peroxidación de lípidos evitando la formación de radicales peroxilos y reduce el radical perferrilo formándose peróxido de hidrógeno, lo que previene no sólo la peroxidación lipídica, sino también la oxidación de proteínas. El CoQ también previene la oxidación de las bases del ADN, lo cual es especialmente importante en el caso del ADN mitocondrial (mtDNA) donde este tipo de daños es difícil de reparar (Bentinger et al., 2010).

Otra de sus funciones es la regulación de la apertura del poro de transición mitocondrial (PTP). La membrana interna de la mitocondria posee una baja permeabilidad a los iones y solutos que permite mantener el gradiente de electrones y protones. Para poder llevar a cabo el transporte transmembrana se produce el poro de transición de permeabilidad mitocondrial. Algunas moléculas de naturaleza quinónica tienen efecto sobre este poro favoreciendo o evitando su apertura. Entre las moléculas que la evitan se encuentra el CoQ (Walter et al., 2000), impidiendo que, como consecuencia de la apertura, la célula entre en apoptosis mediante la pérdida del potencial de membrana, liberación del citocromo *c*, activación de la cascada de caspasas y fragmentación del ADN (Bernardi and Di Lisa, 2014).

El CoQ es además cofactor de las proteínas desacoplantes o termogeninas (UCP), siendo estas incapaces de translocar protones en su ausencia (Echtay et al., 2000). Las proteínas desacoplantes están presentes en la membrana mitocondrial interna y translocan protones hacia la matriz mitocondrial desacoplando el gradiente de protones de la fosforilación oxidativa y produciendo la liberación de calor. Estas proteínas podrían actuar en la termogénesis (Klingenberg and Echtay, 2001), en la supresión de radicales de oxígeno y una alteración de su expresión podría estar relacionada con enfermedades humanas como la obesidad o la diabetes (Turunen et al., 2004).

Otra función que posee el CoQ es la de actuar como transportador de electrones en la síntesis *de novo* de pirimidinas a través de la vía del orotato (Jones, 1980). El dihidroorotato, proveniente del citosol, entra en la mitocondria donde es oxidado a

orotato por la dihidroorotato deshidrogenasa. En esta reacción dos electrones son cedidos al CoQ que, a su vez, se reduce. El orotato, una vez sintetizado, vuelve al citosol para dar lugar a la formación de uracil monofosfato (UMP).

La β -oxidación de los ácidos grasos es otro proceso en el que el CoQ está implicado como transportador de electrones. En este proceso se produce poder reductor en forma de FADH_2 . Los electrones pasan del FADH_2 a la proteína ETF y de esta a la proteína ETFDH, que finalmente los cede al CoQ (Watmough and Frerman, 2010; Zhang et al., 2006).

El CoQ provoca en linfocitos y monocitos la liberación a la sangre de sustancias que actúan como señal para la expresión de genes dependientes de $\text{NF}\kappa\text{B1}$ que provocan una respuesta antiinflamatoria (Schmelzer et al., 2007).

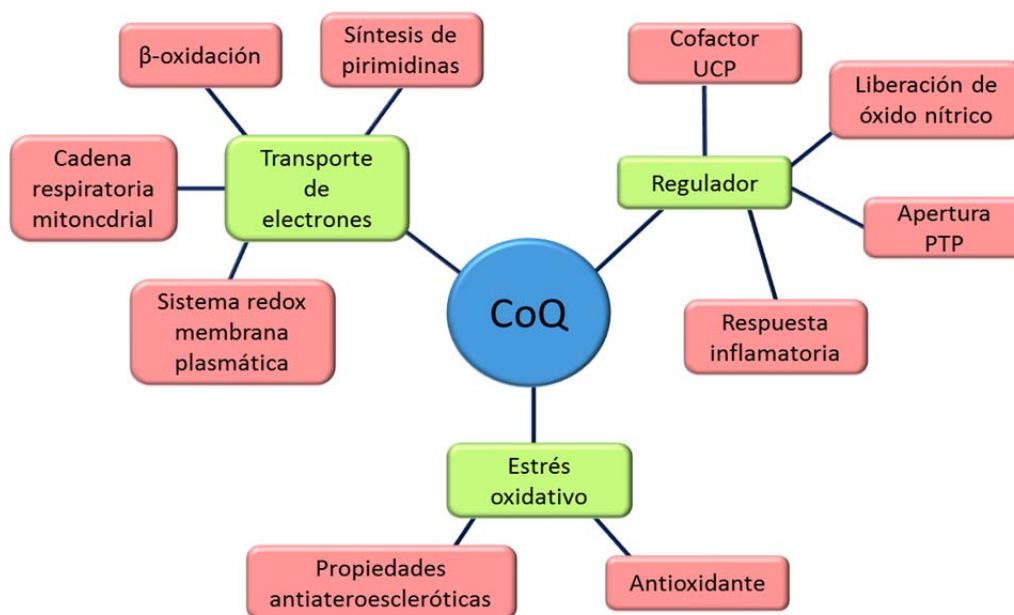


Figura 3. Funciones del CoQ.

También se ha observado que el CoQ posee propiedades antiateroescleróticas protegiendo el LDL de la oxidación. Además, reduce los niveles de las peroxidasas asociadas con lipoproteínas en las lesiones ateroscleróticas. También disminuye los niveles de la β 2-integrina CD11b en monocitos, que contrarresta la interacción celular

monocito-endotelio (Thomas et al., 1996; Turunen et al., 2002), favoreciendo por este mecanismo la protección cardiovascular (Mortensen et al., 2014).

El CoQ estimula la liberación de óxido nítrico endotelial, lo que ayuda a mejorar la disfunción endotelial en pacientes con diabetes tipo 2 (Hamilton et al., 2007).

Debido a que posee todas estas funciones, el CoQ es una molécula esencial para la fisiología celular por lo que el mantenimiento de unos niveles adecuados de CoQ es imprescindible para el buen funcionamiento de un organismo.

1.2. Síntesis de CoQ

La fuente principal de CoQ en la célula es la síntesis de *novo*. Esta molécula se sintetiza en la membrana interna de la mitocondria (Tran and Clarke, 2007). Se ha propuesto la posibilidad de una síntesis parcial de CoQ en el sistema de endomembranas (Kalén et al., 1990; Mugoni et al., 2013) pero hasta la fecha, todas las proteínas responsables se localizan en la mitocondria (Tran and Clarke, 2007). Es ahí donde se encuentra principalmente, aunque se distribuye mediante el sistema de transporte de endomembranas hasta otras membranas celulares tanto en células humanas como en levaduras (Fernández-Ayala et al., 2005; Padilla-López et al., 2009).

Numerosos estudios han ayudado al entendimiento de la ruta de síntesis en procariotas y levaduras y, gracias a que está bastante conservada, podemos tener una idea de cómo funciona en mamíferos, donde no está tan bien caracterizada. Como se ha dicho anteriormente, la molécula de CoQ está compuesta por un anillo benzoquinónico, el ácido 4-hidroxibenzoico (4-HB), y una cola de naturaleza poliisoprenoide. En eucariotas, el 4-HB se sintetiza a partir de la tirosina aunque en levaduras también puede ser sintetizado a partir del corismato, como ocurre en bacterias (Meganathan, 2001). En eucariotas, la cola isoprenoide se forma a partir del dimetilalil difosfato y el isoprenil difosfato, ambos sintetizados a partir del acetil-coenzima A a través de la ruta del mevalonato. A diferencia de lo que ocurre en eucariotas, en bacterias, la cola poliisoprenoide es formada a través de la ruta del 2-C-

metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) (Lange et al., 2000). Aunque durante décadas se consideró al 4-HB como el único precursor del anillo quinónico, lo cierto es que la levadura *S. cerevisiae* es capaz de sintetizar CoQ utilizando el ácido para-aminobenzoico como precursor (Marbois et al., 2010; Pierrel et al., 2010).

1.3. Síntesis de CoQ en *S. cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es el organismo eucariota en el que mejor se conoce el proceso de síntesis de CoQ a través del hallazgo de grupos de complementación para distintos mutantes deficientes en síntesis de CoQ. De esta manera se han identificado al menos 11 genes (*COQ1-9*, *Arh1* y *Yah1*) que están implicados en la biosíntesis de CoQ (Pierrel et al., 2010; Tran and Clarke, 2007). Los genes *COQ* son nucleares, pero las proteínas para las que codifican se localizan en la mitocondria, donde es sintetizado el CoQ (Tran and Clarke, 2007). En mamíferos, los genes *COQ* han sido identificados por homología de secuencia y algunos de ellos complementan funcionalmente en el mutante nulo de levadura correspondiente, como en el caso de *COQ2* (Forsgren et al., 2004), *COQ3* (Jonassen and Clarke, 2000), *COQ4* (Casarin et al., 2008), *COQ6* (Heeringa et al., 2011) y *COQ7* (Vajo et al., 1999), lo cual indica que la ruta está bastante conservada en humanos.

El primer paso de la ruta de síntesis es la formación de la cola poliisoprenoide llevada a cabo por Coq1p (Ashby and Edwards, 1990), una poliisoprenil difosfatasa de la cual depende el número de unidades de isopreno que contiene. A continuación, Coq2p se encarga de unir la cola isoprenoide al anillo benzoquinónico dando lugar al ácido 4-hidroxi-3-poliprenil benzoico (HHB) (Ashby et al., 1992). Coq2p es hasta ahora la única proteína integral de membrana de la síntesis de CoQ y se localiza en la membrana mitocondrial interna hacia la matriz (Tran and Clarke, 2007).

A partir de este punto el resto de proteínas Coq (Coq3p-Coq9p) llevan a cabo una serie de sustituciones en el anillo hasta dar lugar a la molécula de CoQ o bien participan en la regulación de este proceso. Coq3p parece ser la responsable de los dos pasos de *O*-metilación (Hsu et al., 1996; Poon et al., 1999), Coq5p se encarga del único paso de *C*-

metilación (Barkovich et al., 1997; Nguyen et al., 2014) y Coq6p y Coq7p son dos hidroxilasas que llevan a cabo la hidroxilación de los carbonos 5 y 6 respectivamente (Marbois and Clarke, 1996; Ozeir et al., 2011). Yah1, una ferredoxina y Arh1, una ferredoxina reductasa, parecen ser necesarias para la síntesis de CoQ, actuando posiblemente como donadores de electrones en el primer paso de hidroxilación catalizado por Coq6p. Coq8p es una presunta quinasa cuya sobreexpresión permite estabilización del complejo de síntesis en ausencia de alguna de las proteínas del complejo (Padilla et al., 2009; Xie et al., 2012), sin embargo, su función se desconoce todavía al igual que ocurre con Coq4p y Coq9p, aunque se cree que podrían intervenir en la regulación y organización del complejo.

También existe una proteína llamada Coq10 que, a diferencia de otras proteínas Coq, parece no estar implicada en la síntesis de CoQ, sino más bien es una proteína de unión a CoQ que se encarga de su transporte en la membrana de la mitocondria (Barros et al., 2005; Cui and Kawamukai, 2009; Murai et al., 2014).

Además de las proteínas directamente implicadas en la síntesis existen otras proteínas que actúan en su regulación, como es el caso de la fosfatasa Ptc7p que actúa activando la síntesis de CoQ a través de la desfosforilación de Coq7p (Martin-Montalvo et al., 2013). También existen la familia de genes nucleares *ADCK* que codifican para proteínas quinasas que contienen el dominio aarF. Los genes humanos *ADCK3* y *ADCK4* presentan alta homología con el gen *COQ8* de levadura del que se ha hablado anteriormente (Ashraf et al., 2013; Xie et al., 2011). La proteína *ADCK2* también está relacionada con la síntesis de CoQ aunque su función es todavía desconocida (Vázquez-Fonseca, 2013).

Gracias a toda esta información podemos hacernos una idea de cómo se lleva a cabo la síntesis de CoQ. Sin embargo, todavía queda por determinar la función de ciertas proteínas directamente implicadas en la síntesis. Tampoco podemos descartar la existencia de nuevas proteínas que participen en este proceso, ya sea directamente o como reguladores.

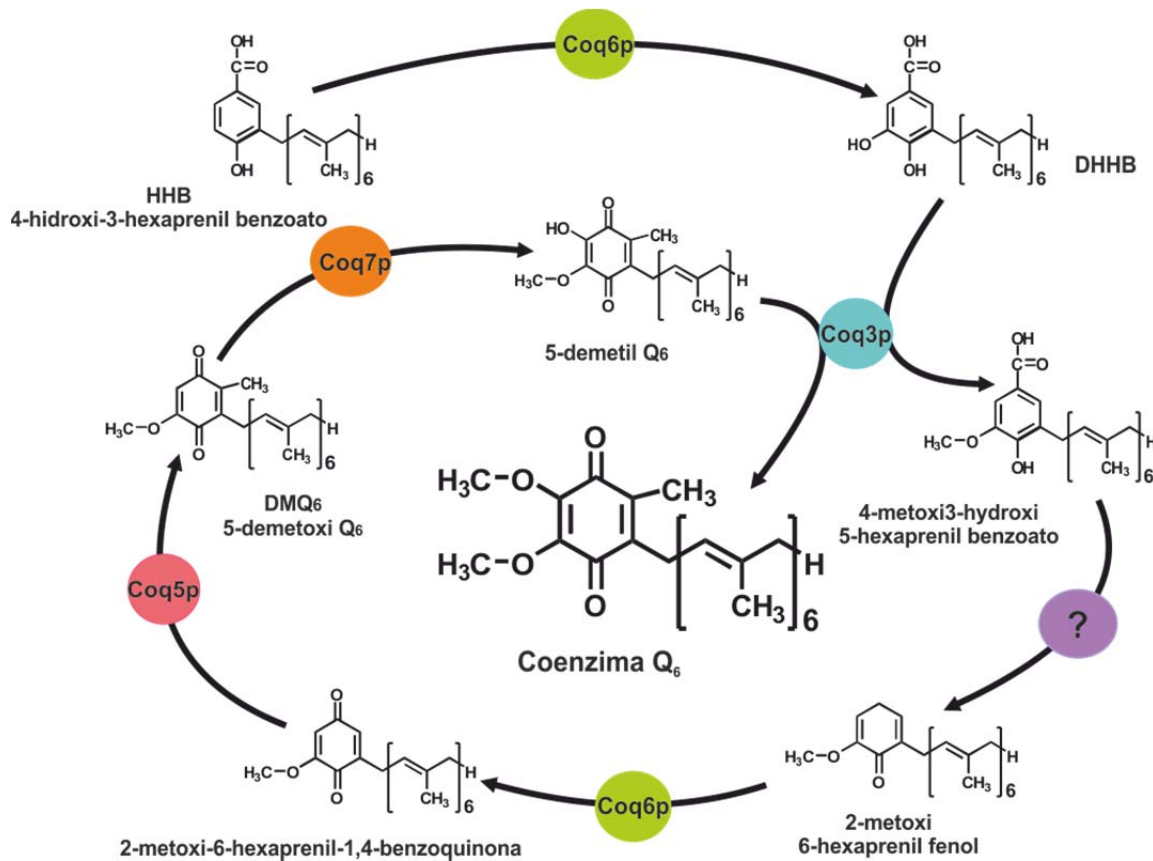


Figura 4. Ruta de síntesis del CoQ. En *S. cerevisiae* hay al menos 11 proteínas implicadas en la ruta de síntesis del CoQ. A partir de la molécula de HHB las proteínas Coq (Coq3p-Coq9p) llevan a cabo una serie de modificaciones en el anillo quinónico hasta dar lugar a la molécula de CoQ.

2. Síndrome de deficiencia de CoQ

2.1. Las enfermedades mitocondriales

Las enfermedades mitocondriales son aquellas patologías que se deben a un defecto en alguna de las funciones mitocondriales. Generalmente, este defecto acaba por producir un mal funcionamiento de la cadena respiratoria, ya sea directa o indirectamente, por lo que también se conocen como afecciones de la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Tienen una prevalencia de al menos 1 de cada 5000 personas entre adultos y niños (Schaefer et al., 2004) por lo que se consideran enfermedades raras. Son un grupo de patologías altamente heterogéneo, tanto por sus síntomas como por sus causas, lo que las hace difíciles de diagnosticar. A pesar de esto, hay una

serie de características clínicas clave que hacen sospechar que se trata de una enfermedad mitocondrial (Tabla 1).

Síndrome	Características
CPEO	Oftalmoplegia externa progresiva crónica
Síndrome de Pearson	Anemia sideroblástica, disfunción pancreática exocrina
Síndrome de Kearns-Sayre	Demencia, diabetes mellitus, sordera, miopatía, hipoparatiroidismo y disfagia
MELAS	Encefalomiopatía, migraña, vómitos, demencia, epilepsia, sordera, ataxia, retinosis pigmentaria, cardiomiopatía, disfunción tubular renal proximal y miopatía
MERRF	Mioclonía, convulsiones, miopatía mitocondrial y ataxia cerebelar
NARP	Retinopatía pigmentaria, ataxia y neuropatía periférica
Síndrome de Leigh	Encefalopatía cerebelar o del tronco del encéfalo
LHON	Pérdida de visión debida a atrofia óptica bilateral.
GRACILE	Retraso en el crecimiento, aminoaciduria, colestasis, acidosis láctica y muerte temprana
Síndrome de Barth	Miopatía mitocondrial, cardiopatía, retraso en el crecimiento y leucopenia
MNGIE	Dismotilidad gastrointestinal, caquexia, neuropatía periférica, ptosis y pérdida auditiva sensoneural

Tabla 1. Principales síndromes asociados a enfermedades mitocondriales

Debido a que existe un problema en el sistema principal de obtención de energía de la célula, las enfermedades mitocondriales afectan sobre todo a los tejidos con mayor demanda energética como cerebro, músculo esquelético y cardíaco, riñones, ojos y sistema endocrino (Keogh and Chinnery, 2013). Pueden ser debidas a mutaciones en el mtDNA o en el ADN nuclear (nDNA). Para su diagnóstico se pueden llevar a cabo diferentes pruebas genéticas para determinados síndromes en muestras de orina, sangre, mucosa bucal o incluso una biopsia muscular (Keogh and Chinnery, 2013). A pesar de que la mayoría de los pacientes finalmente son diagnosticados,

fundamentalmente por los síntomas que muestran, aún queda un buen número de ellos en cuyo caso no se conocen las causas de la patología.

2.2. La deficiencia de CoQ

Entre las enfermedades mitocondriales se ha descrito el síndrome de deficiencia de CoQ (Navas, 2014). Se considera que un individuo presenta deficiencia cuando los niveles de CoQ en determinados tejidos son inferiores a un valor considerado como control (proveniente de numerosas medidas llevadas a cabo en individuos sanos). Estos valores no siempre están bien definidos. Niveles de CoQ que para un paciente resultan patogénicos pueden no producir ningún tipo de trastorno en otro. En nuestro laboratorio disponemos de un servicio de Fisiopatología y Bioenergética en el cual se lleva a cabo la cuantificación de CoQ por HPLC mediante detección UV y electroquímica. Este laboratorio presta servicio a hospitales públicos y privados de Andalucía y ha analizado hasta el día de hoy cientos de muestras de pacientes para su diagnóstico. En nuestro caso, consideramos que existe una clara deficiencia cuando los valores sobrepasan - 2 veces la desviación estándar de los valores de referencia . Los valores de referencia varían mucho de un tipo de muestra a otro y tienen un rango bastante amplio. Por ejemplo, en músculo, el rango que se considera normal va desde los 300 a los 700 pmoles de CoQ₁₀ / mg de proteína.

La deficiencia de CoQ puede ser primaria, debida a mutaciones en los genes directamente implicados en la síntesis de CoQ, o secundaria, si las mutaciones se encuentran en genes no relacionados directamente con la síntesis pero que indirectamente producen una bajada de los niveles de CoQ. La deficiencia secundaria puede ser debida a mutaciones en genes como *APTX*, *ETFDH* y *BRAF* (Aeby et al., 2007; Quinzii and Hirano, 2011), a una depleción del mtDNA (Matsuoka et al., 1991; Montero et al., 2013), insuficiencia en la dieta o el uso de fármacos como las estatinas (Littarru and Langsjoen, 2007). En el caso de mutaciones en el gen *ETFDH*, aunque la deficiencia de CoQ sea una consecuencia indirecta, la proteína codificada por este gen mantiene una relación directa con la molécula de CoQ ya que cede electrones provenientes de la β -oxidación de los ácidos grasos al CoQ. Esta bajada en los niveles de CoQ puede ser

debida a que, mediante algún mecanismo de retroalimentación, se regula negativamente la síntesis de CoQ (Gempel et al., 2007). También podría ser debido a que la unión incorrecta de la enzima al CoQ haga que este se degrade (Olsen et al., 2003).

En la mayoría de los casos, las mutaciones que causan deficiencia de CoQ tienen un modo de herencia autosómico recesivo y los síntomas suelen manifestarse durante la niñez. La suplementación con CoQ₁₀ lleva a la mejora de algunos pacientes pero esto no ocurre en todos los casos, ya que depende de los síntomas y del origen de la deficiencia (Quinzii and Hirano, 2010; Salviati et al., 2005; Yubero et al., 2014). Con respecto a los síntomas, es un síndrome muy heterogéneo asociado principalmente a cinco fenotipos (Quinzii and Hirano, 2010; Quinzii et al., 2014):

- **Encefalomiopatía:** En 1989 se describió el primer caso de pacientes con deficiencia de CoQ, el caso de dos hermanas con miopatía mitocondrial, elevados niveles de creatina quinasa en suero, mioglobulinuria, acidosis láctica y disfunción del sistema nervioso central asociados con una baja actividad de los complejos respiratorios y bajos niveles de CoQ en músculo (Ogasahara et al., 1989). Este fue el primer caso de encefalopatía asociado a deficiencia de CoQ y desde entonces han aparecido otros muchos con un cuadro clínico similar.

- **Enfermedad multisistémica infantil severa:** Los pacientes presentan nistagmus, atrofia óptica, pérdida auditiva neurosensorial, ataxia, distonia, debilidad y nefropatía progresiva (Rötig et al., 2000; Salviati et al., 2005). En la mayoría de los casos es debida a una causa primaria de CoQ₁₀.

- **Ataxia cerebelosa:** El fenotipo más común asociado con la deficiencia de CoQ es la ataxia y atrofia cerebelar infantil (Musumeci et al., 2001). Otros síntomas asociados son neuropatía, ataques, retraso mental, debilidad muscular e hipogonadismo (Quinzii and Hirano, 2010). Se han encontrado pacientes con ataxia debida tanto a deficiencia primaria como secundaria de CoQ.

- **Miopatía aislada:** Se han dado casos de pacientes que presentaban miopatía con acumulación de lípidos y disfunción de la cadena respiratoria (Horvath et al., 2006; Lalani et al., 2005) debido a mutaciones en el gen *ETFDH* (Gempel et al., 2007), aunque mutaciones en este gen no siempre van asociadas a una deficiencia de CoQ.
- **Síndrome nefrótico:** En 2007 se describieron por primera vez dos pacientes que padecían glomerulopatía asociada a una deficiencia de CoQ debida a mutaciones en el gen *COQ2* (Diomedi-Camassei et al., 2007). Además, el síndrome nefrótico resistente a esteroides se ha relacionado con sordera sensorineural en pacientes con mutaciones en el gen *COQ6* (Heeringa et al., 2011) y el gen *ADCK4* (Ashraf et al., 2013).

La falta de CoQ en la célula modifica sustancialmente las reacciones redox y, por tanto, es de esperar que se produzcan una serie de modificaciones en el metabolismo bioenergético. En un estudio reciente realizado por nuestro grupo en fibroblastos de pacientes con deficiencia de CoQ, tanto primaria como secundaria, se observó que esta deficiencia producía un cambio en la expresión de determinados genes como forma de adaptación a la disfunción mitocondrial (Fernández-Ayala et al., 2013). Estos cambios llevaban a las células hacia un metabolismo glicolítico mientras que se reprimían genes implicados en la activación del metabolismo lipídico y respiratorio. La suplementación con CoQ reactivaba el metabolismo respiratorio aunque no el de lípidos. La deficiencia de CoQ también conduce a las células hacia un estado de supervivencia en estas condiciones por medio de la activación del ciclo celular, crecimiento y mantenimiento de un estado indiferenciado además de activar la respuesta a estrés e inhibir la apoptosis. Tras la suplementación con COQ se observó un aumento de la respuesta a estrés e inmunológica pero sólo se restauró parcialmente la apoptosis. Tanto el ciclo celular como el crecimiento no se vieron afectados por esta suplementación. Esta adaptación celular está regulada por cambios epigenéticos por demetilación de genes implicados en el control del ciclo celular, la apoptosis y la respuesta a estrés para ayudar a la célula en estas condiciones de deficiencia.

2.2.1. Deficiencia primaria de CoQ

La deficiencia primaria de CoQ se refiere a la causada por mutaciones en los genes directamente implicados en la síntesis de CoQ. La ataxia cerebelar es el fenotipo más común entre estos pacientes (Montero et al., 2007). Hasta ahora se han encontrado varios casos de pacientes que portaban mutaciones en los genes *PDSS1* (Mollet et al., 2007), *PDSS2* (López et al., 2006), *COQ2* (Diomedi-Camassei et al., 2007; Jakobs et al., 2013; Mollet et al., 2007; Quinzii et al., 2006), *COQ4* (Salviati et al., 2012), *COQ6* (Heeringa et al., 2011), *ADCK3/CABC1* (Lagier-Tourenne et al., 2008; Mollet et al., 2008), *COQ9* (Duncan et al., 2009) y *ADCK4* (Ashraf et al., 2013).

En 2006 se publicó el caso de un niño con síndrome de Leigh severo, síndrome nefrótico y deficiencia de CoQ₁₀ en fibroblastos y músculo debido a una mutación en heterocigosis en el gen *PDSS2* (López et al., 2006) que codifica para la subunidad 2 de la poliprenil difosfato sintasa, enzima encargada de la síntesis de la cola poliisoprenoide del CoQ. En 2007 apareció el caso de dos hermanos de padres consanguíneos que presentaban sordera, encefaloneuropatía, obesidad, livedo reticularis y valvulopatía debidos a una deficiencia de CoQ causada por una mutación en homocigosis en este mismo gen (Mollet et al., 2007).

En 2006 apareció por primera vez el caso de dos hermanos con una mutación en homocigosis en el gen *COQ2* (Quinzii et al., 2006). Este fue además el primer caso de diagnóstico molecular en pacientes con deficiencia de CoQ. Ambos presentaban problemas renales entre otros síntomas y mejoraron tras el tratamiento con CoQ₁₀. Posteriormente, apareció el caso de dos hermanos con una delección en homocigosis en *COQ2* (Mollet et al., 2007), uno de los cuales presentaba problemas neurológicos, síndrome nefrótico, hepatopatía, pancitopenia, diabetes, convulsiones y acidosis láctica, hasta que murió de fallo multiorgánico a los 12 días de vida. El hermano mayor presentaba anemia, fallo hepático e insuficiencia renal y murió con un día de edad. En 2007 aparecen otros dos casos de pacientes con mutaciones en *COQ2* con glomerulopatía y déficit de CoQ (Diomedi-Camassei et al., 2007). Recientemente, se ha publicado el caso de dos gemelos dicigóticos de padres consanguíneos con

mutaciones en este gen. Los dos hermanos presentaban apnea, convulsiones, problemas alimenticios y edema generalizado, además de necesitar, en ocasiones, respiración artificial. Sin embargo, a diferencia de otros pacientes con mutaciones en *COQ2*, estos no presentaban problemas renales. Los dos hermanos murieron a los pocos meses de nacer (Jakobs et al., 2013).

A pesar de ser un gen de función desconocida, también se han descrito pacientes con mutaciones en *COQ4* (Jimenez-Ortega, 2009; Salviati et al., 2012) de los que se tratará con mayor detalle más adelante.

También se han descrito mutaciones asociadas a la deficiencia de CoQ en el gen *COQ6*. Seis mutaciones diferentes en homocigosis en 13 pacientes pertenecientes a 7 familias distintas parecen estar relacionadas con un temprano síndrome nefrótico resistente a esteroides y sordera sensoneuronal (Heeringa et al., 2011).

Han sido publicados varios casos de mutaciones en el gen *ADCK3/CABC1* (Lagier-Tourenne et al., 2008; Mollet et al., 2008), el homólogo del gen *COQ8* en levaduras. Los pacientes presentan ataxia cerebelar y otros síntomas asociados a una deficiencia de CoQ, que algunos autores denominan ataxia cerebelar recesiva autosómica de tipo 2 (Lagier-Tourenne et al., 2008). A diferencia de lo que ocurre con otros genes *COQ*, las mutaciones en *ADCK3* provocan un fenotipo más suave, lo que podría deberse a que este gen tiene una función reguladora en la síntesis de CoQ o que existan otras proteínas con una función redundante (Laredj et al., 2014).

Otro gen perteneciente a la familia *ADCK* es *ADCK4*, que al igual que *ADCK3* también presenta alta homología al gen *COQ8* de levaduras. Mutaciones en *ADCK4* inducen una deficiencia de CoQ asociada al síndrome nefrótico resistente a esteroides (Ashraf et al., 2013).

En 2009 aparece el caso de otro paciente que presentaba acidosis láctica, desarrollo tardío multisistémico, ataques, cardiomiopatía hipertrófica y disfunción tubular renal

con deficiencia de CoQ debida a una mutación en el gen *COQ9*. El paciente murió a los 2 años de edad (Duncan et al., 2009).

2.2.2. Diagnóstico y tratamiento de la deficiencia de CoQ

Cuando se sospecha de una deficiencia de CoQ es importante su diagnóstico ya que, cuanto antes se inicie el tratamiento, mayor será la eficacia y se podrían evitar daños irreversibles. Para ello se deben estudiar determinados parámetros como los niveles de lactato en sangre. A partir de una biopsia de músculo se puede estudiar si existe proliferación mitocondrial elevada, acumulación de lípidos o una disminución en la actividad de los complejos de la cadena, sobre todo las actividades de los complejos I+III (NADH-citocromo *c* oxidorreductasa) y II+III (succinato-citocromo *c* oxidorreductasa). Sin embargo, aunque se obtenga un resultado negativo no podemos descartar que exista deficiencia de CoQ. Por ello, la forma más segura de saber si existe deficiencia es la medida directa de los niveles de CoQ mediante HPLC-ECD. Esta medida puede llevarse a cabo en fibroblastos, aunque se complementa con la medida en la biopsia de músculo (Quinzii and Hirano, 2010). Este análisis no suele realizarse en sangre ya que los niveles de CoQ₁₀ pueden verse alterados por la dieta (Montero et al., 2008).

Aunque no siempre es así, la mayoría de pacientes con encefalomiopatía, miopatía y enfermedad infantil multisistémica presentan una proliferación mitocondrial anormal, acumulación de lípidos, actividad reducida de la actividad de los complejos I+III y II+III y niveles bajos de CoQ₁₀ en músculo. En fibroblastos los niveles de CoQ pueden variar y se observa alta mitofagia para mantener la supervivencia celular (Rodríguez-Hernández et al., 2009). En pacientes con nefropatía aislada se han observado bajos niveles de CoQ y de las actividades de la cadena respiratoria tanto en músculo como fibroblastos. En pacientes con ataxia, al analizar el músculo, se observó proliferación mitocondrial, fibras COX-negativas y acumulación lipídica, además de bajos niveles de CoQ (Emmanuele et al., 2012).

El principal tratamiento para este tipo de deficiencia es la suplementación con CoQ₁₀. La dosis recomendada es de hasta 2400 mg al día en adultos y 30mg/kg al día en niños,

en ambos casos repartidos en tres tomas diarias (Emmanuele et al., 2012). La deficiencia de CoQ es una de las pocas enfermedades mitocondriales para la que existe tratamiento aunque la respuesta es muy diferente dependiendo del paciente. Los pacientes con encefalomiopatía muestran una mejora en el músculo y en alguno de ellos mejoró la encefalomiopatía tras el tratamiento. En el caso de miopatía aislada, también hubo una mejoría en la mayoría de ellos y otros pacientes respondieron al tratamiento con riboflavina (100mg al día) (Gempel et al., 2007). Cuando se trata de enfermedad infantil multisistémica, el CoQ mejora los síntomas miopáticos y la encefalopatía y mejora la proteinuria en pacientes con nefropatía aislada. En el caso más común, el de la ataxia cerebelar, puede mejorar los síntomas musculares y mejorar la ataxia (Artuch et al., 2006; Emmanuele et al., 2012; Pineda et al., 2010). Aun así, no todos los pacientes responden al tratamiento. El hecho de que en algunos casos no haya mejoría de los síntomas relacionados con el sistema nervioso podría ser debido a que sean daños irreversibles o a que el CoQ no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (Bentinger et al., 2003).

3. Regulación de la síntesis de CoQ en eucariotas

3.1. Síntesis de CoQ y metabolismo bioenergético

La levadura *S. cerevisiae* es un fermentador aerobio facultativo que puede crecer en glucosa incluso por fermentación en presencia de oxígeno, pero también puede crecer mediante respiración en una fuente de carbono no fermentable (Gancedo, 1998). Puesto que el CoQ es necesario principalmente durante la respiración, se ha estudiado la activación de la síntesis en el paso de transición del metabolismo fermentativo al respiratorio (Sippel et al., 1983). Se ha demostrado que altos niveles de glucosa en el medio de cultivo disminuyen la cantidad de CoQ en *S. cerevisiae*, a la vez que aumentan los niveles del intermediario quinónico 3,4-dihidroxi-5-hexaprenilbenzoato (3,4-DHHB). Esto además sugiere que la metilación de esta molécula podría ser un paso de regulación en la represión catabólica por glucosa. Esta represión se lleva a cabo a través de la quinasa Snif1, que permanece reprimida en presencia de glucosa

pero, cuando los niveles de glucosa disminuyen, Snif1 participa en la desrepresión de los genes implicados en el catabolismo de otras fuentes de carbono como el etanol, el lactato o el glicerol (Gancedo, 1998). La adición de AMPc en presencia de glucosa restaura los niveles de CoQ a los que se darían en condiciones de no represión catabólica (Sippel et al., 1983).

Durante el crecimiento en un medio con glucosa como el YPD, la glucosa se consume y se produce etanol. Cuando no hay glucosa y se comienza a consumir el etanol se produce un cambio de metabolismo denominado fase post-diáuxica (Pedruzzi et al., 2000), en la que la célula modifica su metabolismo de fermentativo a respiratorio y, por tanto, requiere una mayor concentración de CoQ. Relacionados con estos cambios en el metabolismo, los niveles de CoQ y el intermediario demetoxi-CoQ (DMQ) cambian durante el crecimiento en un medio como el YPD. Al principio, en alta glucosa, lo que se acumula es HHB, ya que la levadura tiene suficiente energía que obtiene de la fermentación (Poon et al., 1995). Cuando la glucosa va disminuyendo se va acumulando DMQ hasta que comienza la fase post-diáuxica donde los niveles de DMQ disminuyen y aumentan los de CoQ (Padilla et al., 2009). La expresión de algunos de los genes *COQ* como *COQ3*, *COQ5*, *COQ7* y *COQ8* correlacionan con los cambios en los niveles de CoQ (Padilla et al., 2009).

Una forma fácil de comprobar si una levadura es deficiente en respiración es cultivarla en un medio que contiene glicerol como fuente de carbono. El cambio de un medio con glucosa a un medio con glicerol provoca un aumento en los niveles de expresión de varios de los genes *COQ* como ocurre con *COQ4*, *COQ5*, *COQ7* y *COQ8* (Belogrudov et al., 2001; Hagerman et al., 2002; Padilla et al., 2009). Este aumento en la expresión puede ser de hasta tres veces en el caso de *COQ5*, *COQ7* y *COQ8* (Padilla et al., 2009).

Se dispone de poca información sobre los factores de transcripción que regulan la expresión de los genes *COQ*. *COQ5* es regulado por Hap2p, una subunidad del complejo HAP (*heme activated-glucose repressed CCAAT-binding complex*), un regulador global de la expresión de genes implicados en respiración (Hagerman and

Willis, 2002). También es regulado negativamente por Mig1p que participa en la represión por glucosa y que a su vez es fosforilado por Snf1p inactivándolo en condiciones de baja glucosa (Gancedo, 1998). *COQ2* es regulado positivamente por Hap1p (Harbison et al., 2004; Hickman and Winston, 2007). Mediante la plataforma YEASTRACK (Abdulrehman et al., 2011; Monteiro et al., 2008) se pueden encontrar en los promotores de los genes *COQ* posibles secuencias promotoras reconocidas por factores de transcripción implicados en el metabolismo respiratorio mitocondrial como Hap3p, Hap4p, Hap5p y Adr1p. La falta de aminoácidos aumenta la expresión de los genes *COQ* a través del factor de transcripción Gcn4p (Moxley et al., 2009; Staschke et al., 2010). Esto puede explicarse porque el glutamato es necesario para la síntesis de 16 aminoácidos. La fuente de glutamato es el α -cetoglutarato proveniente del ciclo de Krebs por lo que el metabolismo respiratorio es necesario para la síntesis de aminoácidos.

3.2. Síntesis de CoQ y estrés oxidativo

Una de las funciones principales del CoQ es su papel como antioxidante. El ácido linolénico es un potente activador de la peroxidación lipídica en membranas de levadura (Do et al., 1996) y también en mamíferos (Colquhoun and Schumacher, 2001). En levaduras, la presencia de ácido linolénico aumenta la expresión de genes como *COQ3*, *COQ5* y *COQ7* (Hagerman et al., 2002; Padilla et al., 2009). En el caso de *COQ3* y *COQ7*, además, induce la conversión de DMQ a CoQ (Padilla et al., 2009). Levaduras deficientes en la síntesis de CoQ muestran hipersensibilidad a este tipo de ácidos grasos poliinsaturados (Poon et al., 1997). Mediante la plataforma YEASTRACK (Abdulrehman et al., 2011; Monteiro et al., 2008) también es posible encontrar posibles secuencias promotoras reconocidas por factores de transcripción relacionados con la respuesta de defensa antioxidante como Mns2p, Mns4p, Yap1p y Hsf1p (tabla 4). *COQ1* muestra una respuesta específica a H_2O_2 y sólo *COQ4* y *COQ6* responden a hipertermia.

Factor de transcripción	Posible regulación	Regulación documentada
Hap1p	<i>COQ2</i>	<i>COQ2</i> - (Harbison et al., 2004)
Hap2p	<i>COQ2</i> <i>COQ6</i> <i>COQ7</i>	<i>COQ5</i> - (Hagerman and Willis, 2002)
Hap3	<i>COQ2</i> <i>COQ6</i> <i>PTC7</i>	
Hap4	<i>COQ2</i> <i>COQ6</i> <i>PTC7</i>	
Hap5	<i>COQ2</i> <i>COQ6</i> <i>PTC7</i>	
Mig1p		<i>COQ5</i> - (Hagerman and Willis, 2002)
Gcn4p	<i>COQ8</i> <i>COQ1</i> <i>COQ3</i> <i>COQ4</i> <i>COQ9</i> <i>PTC7</i>	<i>COQ8</i> – (Moxley et al., 2009) <i>COQ7</i> – (Staschke et al., 2010) <i>COQ5</i> – (Moxley et al., 2009)
Adr1p	<i>COQ2</i> <i>COQ7</i> <i>COQ9</i>	

Tabla 2. Regulación de los genes COQ mediante factores de transcripción relacionados con el metabolismo bioenergético en *S. cerevisiae*.

Factor de transcripción	Posible regulación	Regulación documentada
Msn2/4p	<i>COQ1</i>	<i>COQ1</i> - (Lai et al., 2005)
	<i>COQ2</i>	<i>COQ6</i> - (Berry and Gasch, 2008)
	<i>COQ4</i>	
	<i>COQ6</i>	
	<i>COQ7</i>	
	<i>COQ9</i>	
Yap1p	<i>COQ3</i>	<i>COQ1</i> - (Thorsen et al., 2007)
	<i>COQ4</i>	
	<i>COQ5</i>	
	<i>COQ6</i>	
	<i>COQ7</i>	
	<i>COQ8</i>	
Hsf1p		<i>COQ4</i> - (Eastmond and Nelson, 2006)
		<i>COQ6</i> - (Eastmond and Nelson, 2006)

Tabla 3. Regulación de los genes COQ mediante factores de transcripción relacionados con la respuesta a estrés oxidativo en levadura.

En mamíferos, numerosos estudios han demostrado que el CoQ protege frente al estrés oxidativo. En células CEM-C7H2, la adición de CoQ exógeno las protege de la muerte por apoptosis en condiciones de privación de suero por inhibición de la liberación de ceramida y la activación de la caspasa-3 (Fernández-Ayala et al., 2000). Cuando el estrés es suave, la privación de suero provoca una acumulación de CoQ en la membrana plasmática en células HeLa (Barroso et al., 1997). La camptotecina (CPT) es una droga quimioterápica que inhibe la topoisomerasa y provoca daños en el ADN y estrés oxidativo (Gorman et al., 1997). El tratamiento con CPT en diversas líneas celulares tumorales aumenta el contenido total de CoQ₁₀ (Brea-Calvo et al., 2006). Este aumento de los niveles de CoQ se produce a través de la activación de *COQ7* mediante el factor de transcripción NF-κB (Brea-Calvo et al., 2009).

Un paso posterior en el proceso de regulación de la síntesis de CoQ son los mecanismos de regulación postraduccional, que en este caso se centran en

modificaciones postraduccionales de las proteínas Coq y en la formación de un complejo multienzimático.

3.3. Evidencias de la existencia de un complejo de síntesis

Cada vez hay más evidencias de la existencia de un complejo multienzimático necesario para síntesis de CoQ en eucariotas. La primera prueba es la acumulación del mismo intermediario temprano de la síntesis, el HHB en los mutantes nulos para los genes *COQ* (*coq3-coq9*) (Poon et al., 1997). Otro indicio de la existencia de este complejo es que la presencia de algunas proteínas Coq son necesarias para mantener los niveles de otras de estas proteínas. Además, la sobreexpresión de Coq8p ha permitido comprobar la existencia de este complejo y confirmar la doble función de algunas proteínas Coq (Ozeir et al., 2011; Padilla et al., 2009; Xie et al., 2012). A su vez, como veremos a continuación, numerosos experimentos confirman la presencia de las proteínas Coq formando parte de un complejo multiproteico de alto peso molecular y la interacción directa entre algunas de estas proteínas. Por todo ello, cada vez está más aceptada la idea de que las proteínas Coq se organizan formando un complejo indispensable para la síntesis de CoQ.

3.3.1. Acumulación de precursores en mutantes en la síntesis de CoQ

En levaduras, una característica general en los mutantes nulos para algunos de los genes *COQ* (*coq3-coq9*) es la acumulación del mismo intermediario de la síntesis, el HHB (Poon et al., 1997) (Figura 5). Además, se han encontrado mutaciones puntuales en algunas de estas proteínas que afectan de manera menos drástica a la síntesis de CoQ como en el caso de los mutantes puntuales en *COQ7 coq7-1* (Marbois and Clarke, 1996) *qm30*, *e2519* (Padilla et al., 2004) o E194K (Tran et al., 2006). En estos mutantes se acumula DMQ, el sustrato enzimático de Coq7p, en vez de HHB, lo que indica que Coq7p posee una doble función enzimática y estructural, y en el caso de estos mutantes sólo se ve afectada la función enzimática (Figura 5). Esto mismo ocurre en el caso de *COQ5*, en el que mutantes puntuales de levadura son rescatados en respiración por la expresión de su homólogo en *E.coli*, Ubi E, mientras que esta misma

proteína no es capaz de rescatar un mutante nulo de *Coq5* (Baba et al., 2004). Todo esto nos lleva a pensar que algunas proteínas Coq forman parte de un complejo y, además de una función catalítica, poseen una función estructural.

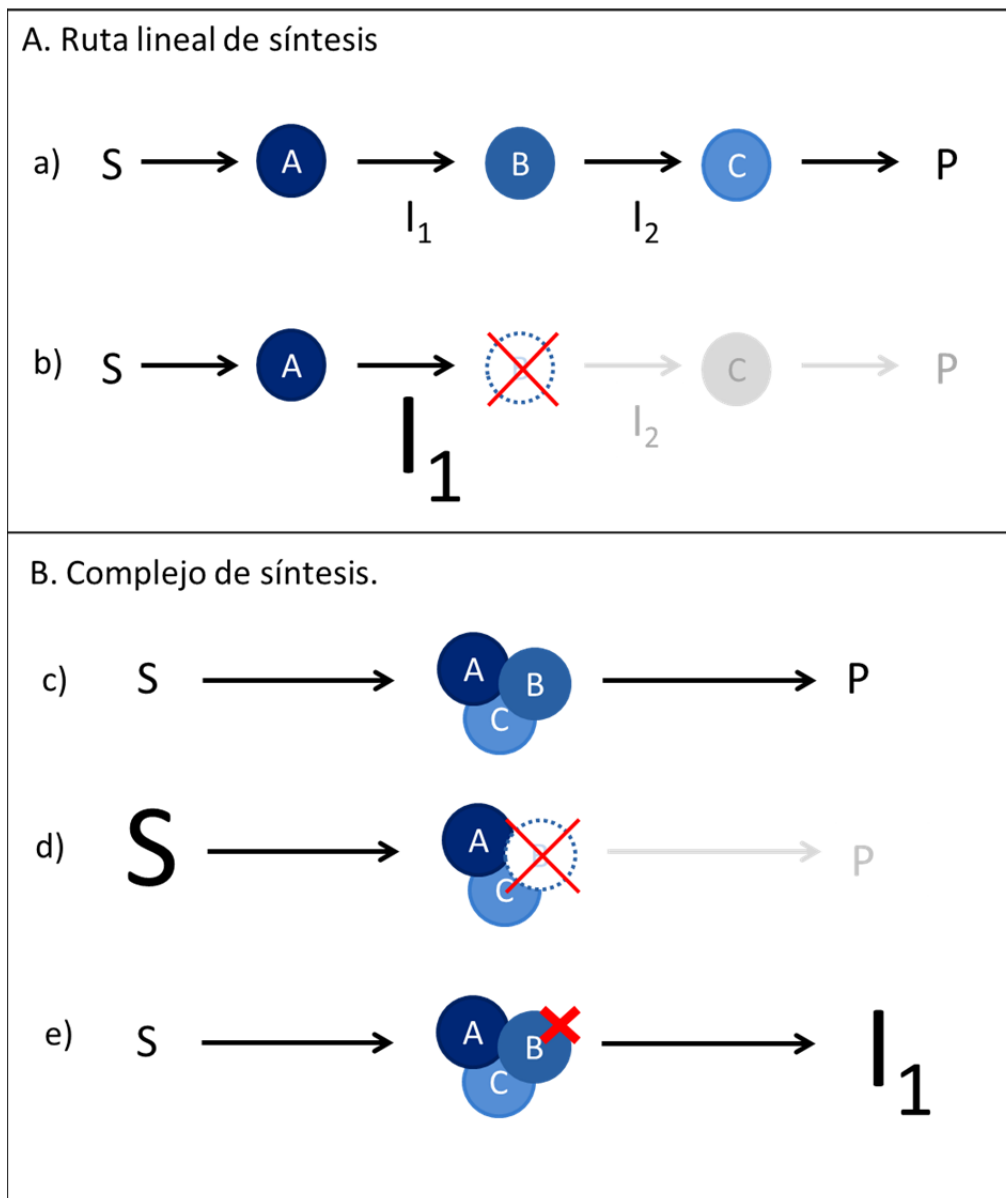


Figura 5. Acumulación de precursores en mutantes en una ruta de síntesis líneal y un complejo de síntesis. **A.** a) En una ruta de síntesis líneal, las distintas proteínas van generando los distintos intermediarios (I_1 e I_2) a partir del sustrato (S) para dar lugar al producto (P). b) Cuando una de las proteínas de la ruta está ausente se produce la acumulación del intermediario que es sustrato de esta proteína que falta (I_1). **B.** c) En una ruta de síntesis llevada a cabo por un complejo, cuando el complejo se une al sustrato se obtiene un producto final. d) Cuando tenemos un mutante nulo para uno de las proteínas del complejo este se desestabiliza y se acumula el sustrato inicial. e) Por el contrario, si tenemos un mutante puntual el complejo puede formarse pero no se acumula el producto final, sino el sustrato de la enzima que está ausente.

3.3.2. Mantenimiento de los niveles de proteínas Coq en los mutantes en la síntesis de CoQ

Con frecuencia, cuando una proteína que forma parte de un complejo está ausente esto puede provocar la desestabilización del complejo. El modelo de ensamblaje de un complejo de proteínas sugiere que si una proteína no puede ensamblarse correctamente está será eliminada (Rugarli and Langer, 2012). Otra de las evidencias de la existencia de un complejo de síntesis de CoQ es que la presencia de algunas de estas proteínas es necesaria para el mantenimiento y función de las demás proteínas del complejo. En el caso de Coq3p, en los mutantes nulos para los genes *COQ*, se observa una bajada tanto de la actividad *O*-metiltransferasa como en los niveles de proteína, sin embargo, los niveles de ARNm se mantienen, lo que podría indicar que la falta de una de estas proteínas conlleva a la degradación de Coq3p (Hsu et al., 2000). El mismo efecto puede verse para otras proteínas (Baba et al., 2004; Belogradov et al., 2001; Gin and Clarke, 2005; Hsieh et al., 2007; Johnson et al., 2005; Tran et al., 2006), aunque no todas se ven afectadas de la misma manera. La expresión de proteínas como Coq6p, Coq7p y Coq9p desaparece en los mutantes nulos para otras proteínas Coq. En el caso de Coq3p y Coq4p se observa sólo una disminución de la expresión. Sin embargo, hay proteínas como Coq1p, Coq2p, Coq5p y Coq8p cuya expresión no se ve afectada en los mutantes nulos, aunque su ausencia si afecta a los niveles de otras proteínas. El hecho de que la expresión de algunas proteínas Coq no se vea afectada puede ser debido a que no formen parte del complejo o a que actúen previamente o en paralelo a la formación del complejo. En el caso de Coq4p, la presencia de esta proteína es necesaria para la mantener los niveles de Coq3p, Coq6p, Coq7p y Coq9p (Belogradov et al., 2001; Marbois et al., 2009).

3.3.3. Estudios de sobreexpresión en la síntesis de CoQ

Coq8p es otra proteína de gran importancia en el mantenimiento del complejo de síntesis de CoQ. Es una presunta quinasa implicada directa o indirectamente en la fosforilación de Coq3p, Coq5p y Coq7p (Martin-Montalvo et al., 2011; Tauche et al., 2008; Xie et al., 2011). Con frecuencia, para el estudio de los complejos de proteínas se utiliza la sobreexpresión de genes que supriman los efectos de determinadas mutaciones. Para el estudio del complejo de síntesis de CoQ, los primeros genes candidatos para analizar el efecto de su sobreexpresión en un mutante nulo *coq7* fueron *COQ4* y *COQ8* debido a su posible función reguladora. La sobreexpresión de *COQ4* no produjo ningún efecto y el mutante siguió acumulando HHB mientras que sobreexpresando *COQ8* la levadura acumulaba DMQ, el sustrato enzimático de Coq7p (Padilla et al., 2009), demostrando que su sobreexpresión permite la formación y estabilización del complejo aun en ausencia de Coq7p. Además, la sobreexpresión de Coq8p rescata los niveles de proteínas como Coq3p, Coq4p, Coq7p y Coq9p en algunos de los mutantes nulos *coq* (Xie et al., 2012; Zampol et al., 2010). A partir de entonces, la sobreexpresión de Coq8p ha servido para ayudarnos a entender la función y el punto de la ruta en el que actúan cada una de las proteínas del complejo. Concretamente, esto permitió determinar que Coq6p lleva a cabo la hidroxilación del carbono 5 en las síntesis de CoQ (Ozeir et al., 2011) y confirmó la actividad C-metiltransferasa de Coq5p (Nguyen et al., 2014; Xie et al., 2012). Al repetir lo mismo en un mutante *coq3* sólo se produjo la acumulación de HHB, lo cual era de esperar. Lo más llamativo es que ocurre lo mismo en el caso de *coq4*, la sobreexpresión sólo produce la acumulación de intermediarios tempranos (Xie et al., 2012). Además, en otros estudios de sobreexpresión de Coq8p en un mutante nulo *coq4* se produce la estabilización de proteínas como Coq6p, Coq7p y Coq9p pero no se observa formación de complejo mediante 2D BN-PAGE/SDS-PAGE (He et al., 2014), lo cual refuerza la idea de que Coq4p es necesaria desde el principio para el ensamblaje del complejo. Por

todo esto, podemos considerar la sobreexpresión de Coq8p como una herramienta muy útil en el estudio de la organización del complejo de síntesis de CoQ.

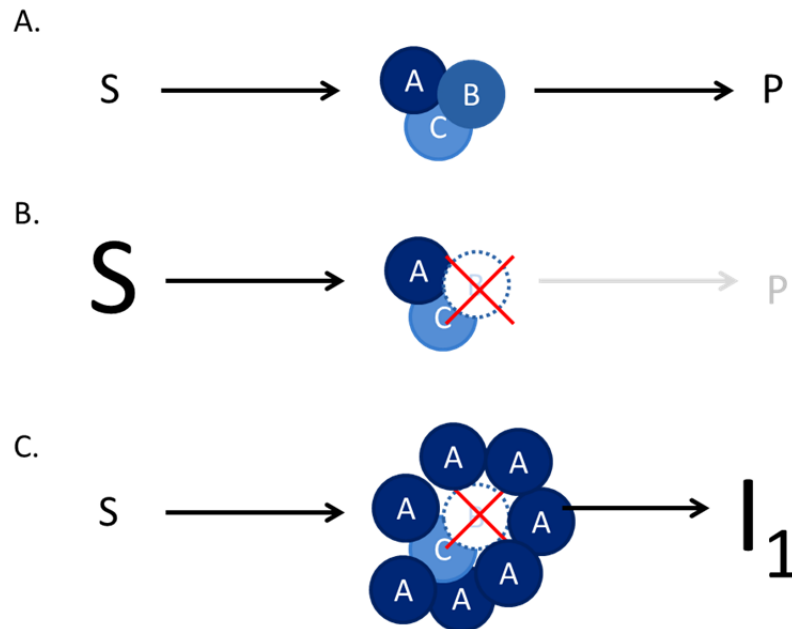


Figura 6. Efecto de la sobreexpresión de una proteína de un complejo en ausencia de otra proteína. **A.** En condiciones normales, cuando un complejo de síntesis se une al sustrato (S) se obtiene un producto final (P). **B.** En ausencia de una de las proteínas del complejo este se desestabiliza y sólo se produce la acumulación del sustrato inicial (S). **C.** La sobreexpresión de una de las proteínas del complejo (A) puede ayudar a la estabilización del complejo en ausencia de otra de las proteínas (B) y el producto acumulado sería el sustrato de la proteína ausente (I₁).

3.4. Composición del complejo de síntesis

Para el estudio del complejo de síntesis se han llevado a cabo diversos experimentos de co-inmunoprecipitación, cromatografía de exclusión molecular y BN-PAGE. Coq3p inmunoprecipita junto con Coq4p (Marbois et al., 2005) y Coq9p lo hace con Coq4p, Coq5p, Coq6 y Coq7p (Hsieh et al., 2007). Mediante cromatografía de exclusión molecular se observó la existencia de un complejo de más de 700 kDa en el que aparecen Coq3p, Coq4p, Coq6p además del intermediario de síntesis DMQ₆ (Marbois et al., 2005). Posteriormente, mediante BN-PAGE, se detectó la presencia de Coq3p, Coq5p, Coq8p (Tauche et al., 2008) y Coq4p (Marbois et al., 2009) en el complejo.

También se ha observado, mediante cromatografía de exclusión molecular, la existencia de un complejo de 1300 kDa que contiene Coq3p, Coq4p y Coq7p (Marbois et al., 2009; Tran et al., 2006).

Este complejo de síntesis parece estar formado no sólo por proteínas, sino además, por algún intermediario de la síntesis. Coq1p y Coq2p, responsables de la formación del HHB, parecen no formar parte del complejo. Sin embargo, en los mutantes nulos *coq1* y *coq2* los niveles de Coq3p disminuyen (Hsu et al., 2000). Es posible que el HHB sea necesario para promover el ensamblaje del complejo. El hecho de que en todos los mutantes nulos *Coq3-Coq9* se acumule el mismo intermediario, HHB (Poon et al., 1997) apoyan esta idea. Además, la adición de CoQ exógeno rescata los niveles de Coq3p en mutantes nulos *coq7*, de Coq4p en mutantes *coq3*, *coq6* y *coq7*, de Coq9p en *coq3*, *coq4*, *coq6* y *coq7* y de Coq7p en un mutante *coq6* (He et al., 2014; Tran et al., 2006). La adición de CoQ exógeno además estabiliza el complejo en un mutante *coq7* llegando a sintetizarse DMQ (Padilla et al., 2009) y produce la acumulación de algunos intermediarios distintos a HHB en algunos mutantes nulos, por lo que podría intervenir en la estabilización del complejo (He et al., 2014).

Una vez que se acepta la existencia de un complejo de síntesis debemos preguntarnos cómo está organizado. Como se ha dicho anteriormente, hay indicios de que un intermediario de la síntesis interviene en su formación. El HHB es un buen candidato, sin embargo, es poco probable debido a que se acumula en todos los mutantes nulos *coq3-coq9* (Poon et al., 1997) en los que no existe complejo. Esto sugiere que es necesaria la participación de alguna proteína para iniciar la formación del complejo una vez que Coq1p y Coq2p han dado lugar al HHB. Coq4p podría ser una buena candidata ya que parece estar presente en todas las fases del complejo y, como veremos más adelante, presenta un dominio de unión a isopreno por lo que ha sido propuesta como proteína de anclaje para la cola poliisoprenoide del HHB sobre el que actuarían el resto de proteínas del complejo para dar lugar a la molécula de CoQ (Rea et al., 2010). En *E. coli*, donde no existe una proteína homóloga a Coq4p, en los mutantes para los genes de la síntesis de CoQ se produce la acumulación de los distintos intermediarios esperados para cada gen mutado (Gibson and Young, 1978)

por lo que generalmente se acepta que no existe un complejo de síntesis. Aun así, se ha descrito la existencia de un complejo de proteínas que contiene 2-octaprenil fenol (2-OPP) capaz de sintetizar CoQ_8 *in vitro* (Knoell, 1979). Sin, embargo la estructura y composición de este complejo no se conoce por lo que, en bacterias, la síntesis de CoQ se considera un proceso lineal (Gibson and Young, 1978). Coq4p es, además, necesario para mantener la presencia de Coq3p y Coq7p en el complejo de 1,3 MDa, ya que en el mutante *Coq4-1*, que sólo es capaz de acumular HHB, estas dos proteínas aparecen en complejos de un peso molecular menor (Marbois et al., 2009). Además, la sobreexpresión de Coq8p en una mutante *Coq4*, aunque estabiliza los niveles de otros componentes del complejo como Coq6p, Coq7p y Coq9p, sólo acumula HHB (Xie et al., 2012). Todos estos resultados apoyan la idea de que Coq4p puede tener una función nucleadora y estabilizadora de este complejo multienzimático.

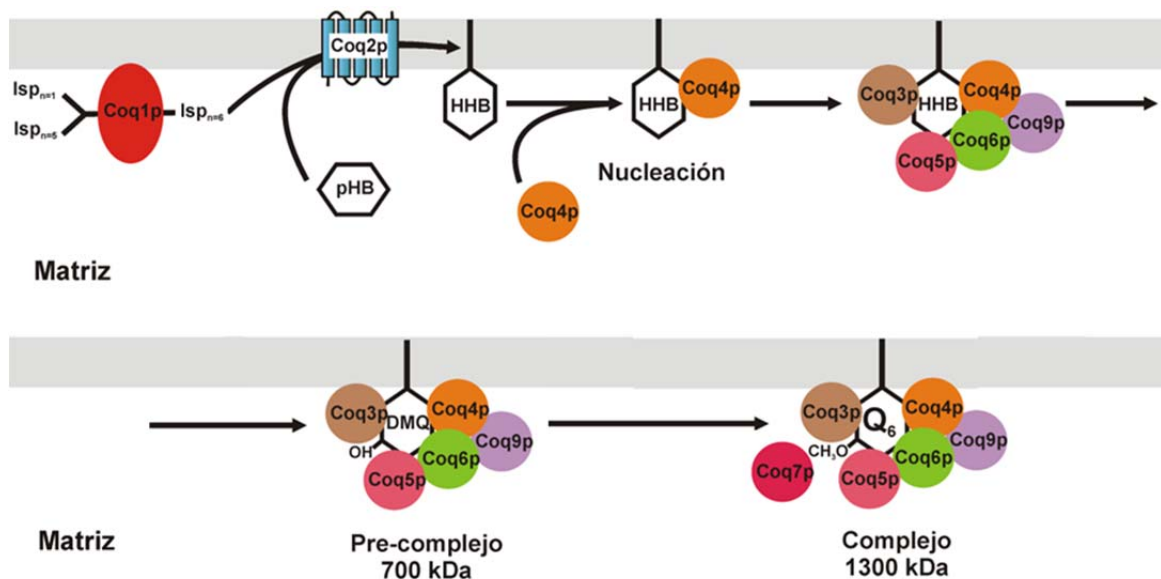


Figura 7. Complejo de síntesis de CoQ. Las proteínas Coq1p y Coq2p se encargan de la formación de la molécula del HHB y a partir de ahí el resto de proteínas Coq se unen formando un complejo multienzimático. Coq4p es probablemente la primera proteína que se une al HHB y sirve como nucleadora del resto de proteínas Coq para formar un precomplejo de 700 kDa al que luego se unirán otras proteínas para formar el complejo final de 1300 kDa.

3.5. Regulación mediante fosforilación

La fosforilación es un mecanismo de señalización celular muy importante que interviene en la regulación del metabolismo bioenergético, el crecimiento y diferenciación o la apoptosis. La fosforilación actúa, por ejemplo, regulando el ciclo celular a través de las quinasas dependientes de ciclina (Cdk). La adaptación celular en respuesta a estrés osmótico también está regulada por fosforilación mediante la ruta de señalización HOG (*High Osmolarity Glycerol*) (Saito and Posas, 2012). La degradación del glucógeno es otro ejemplo de proceso regulado por fosforilación (Hers, 1976). Normalmente, este tipo de regulación se lleva a cabo mediante cascadas de fosforilación. Una de las vías más conocidas es la de las MAP quinasas (Campbell et al., 1995). Esta ruta de señalización actúa sobre una gran cantidad de sustratos entre los que se encuentran factores de transcripción, otras quinasas, fosfolipasas y proteínas del citoesqueleto (Martín et al., 2005). Ya que la fosforilación es un mecanismo de regulación tan frecuente en la célula, no es difícil pensar que también tenga lugar en la mitocondria.

La mitocondria es un orgánulo que posee un papel fundamental en el metabolismo energético. Debido a esto es necesaria la existencia de un complejo sistema de comunicación intracelular que le permita responder rápidamente ante las distintas necesidades celulares. La fosforilación en la mitocondria era algo poco conocido hasta que el hallazgo de numerosas fosfoproteínas y proteínas quinasa mitocondriales hizo pensar en la existencia de mecanismos de regulación mediante este tipo de modificaciones post-traduccionales en la mitocondria (Thomson, 2002).

En el caso de la levadura, la ruta de señalización cAMP/PKA parece estar implicada en la regulación de la biogénesis mitocondrial (Chevtzoff et al., 2010) y la modulación del crecimiento celular según el tipo de metabolismo, ya sea respiratorio o fermentativo (Dejean et al., 2002).

Esta misma ruta está implicada en el control de la producción de ATP a través de la fosforilación de proteínas de la cadena transportadora de electrones (Acin-Perez et al., 2009). Se han encontrado evidencias de que algunas subunidades del complejo I son fosforiladas directamente por la PKA activando el complejo (Papa et al., 1996; Pocsfalvi et al., 2007; De Rasmo et al., 2008). Pero no es el único complejo de la cadena

respiratoria que se fosforila, de hecho hay indicios de que todos los complejos pueden ser fosforilados (Hüttemann et al., 2007). La síntesis de ATP también es controlada mediante la fosforilación del complejo IV (Acin-Perez et al., 2011; Lee et al., 2005; Steenaart and Shore, 1997). El complejo ATP sintasa contiene al menos 7 subunidades que presentan sitios de fosforilación (Reinders et al., 2007). En el caso concreto de la subunidad Atp20p, la fosforilación produce un efecto negativo en la dimerización del complejo.

Además de los complejos de la cadena respiratoria, otro ejemplo en el que la fosforilación regula la actividad de complejos de proteínas mitocondriales es el de la piruvato deshidrogenasa (PDH). Existen al menos dos quinasas (Pkp1p y Pkp2p) encargadas de fosforilar la subunidad Pda1p del complejo inactivándolo, mientras que las fosfatasas Ppp1p y Ppp2p la desfosforilan activándolo de nuevo (Gey et al., 2008).

Por todo ello, ya que la fosforilación es un proceso que ocurre en la mitocondria como sistema de regulación, es factible que estos mecanismos también sean utilizados en la síntesis de CoQ.

3.5.1. Fosforilación en la síntesis de CoQ

Diversos estudios de proteómica llevados a cabo en la levadura no muestra ninguna proteína Coq fosforilada (Amoutzias et al., 2012; Brinkworth et al., 2006). Sin embargo, este resultado negativo puede deberse a la baja proporción en que se encuentran las proteínas Coq con respecto al proteoma completo (Ghaemmighami et al., 2003). La abundancia media de las proteínas Coq es un 25% del proteoma completo (Ghaemmighami et al., 2003). Coq5p muestra la mayor abundancia dentro de las proteínas y su expresión representa sólo el 0,64% comparada con la proteína más abundante en levaduras, Pma1p. Precisamente, sólo Coq5p ha sido detectada como fosfoproteína en un estudio que usa una metodología con mayor resolución que mejora la detección de fosfopéptidos (Kanshin et al., 2013). De hecho, experimentalmente se ha observado que Coq5p junto con Coq3p y Coq7p son fosforiladas de manera dependiente de Coq8p, una presunta quinasa (Tauche et al.,

2008; Xie et al., 2011). En el caso de Coq7p, además, se ha demostrado que posee tres residuos fosforilables (Martin-Montalvo et al., 2011) previamente detectados por análisis *in silico* con ScanProsit (de Castro et al., 2006).

La fosforilación de las proteínas Coq parece ser un paso de activación para la síntesis de CoQ ya que la falta de la presunta quinasa, Coq8p, hace que no se forme complejo (Xie et al., 2011) y que sólo se acumule HHB (Do et al., 2001). Lo que no sabemos todavía es si la fosforilación es necesaria para que se produzca el ensamblaje del complejo o se produce una vez que el complejo está formado. Esto nos indicaría si la acción de Coq8p es previa a la acción de Coq4p o si Coq4p actúa de manera independiente a Coq8p.

A diferencia de lo que ocurre con otras proteínas Coq, la fosforilación de Coq7p disminuye la síntesis de CoQ (Martin-Montalvo et al., 2011). Se detectaron tres sitios de fosforilación en esta proteína mediante análisis de secuencia con el programa ScanProsit (de Castro et al., 2006). Estos residuos fueron modificados a alanina para conseguir una versión de la proteína permanentemente desfosforilada y se observó un aumento en los niveles de CoQ en la levadura. También se obtuvo una versión de la proteína permanentemente fosforilada sustituyendo los aminoácidos por glutámico o aspártico y se observó una disminución en los niveles de CoQ. En el caso de Coq7p, esta fosforilación hace que disminuya la síntesis de CoQ y se acumule DMQ, lo cual además demuestra que Coq7p actúa como un importante punto de control en la síntesis de CoQ (Martin-Montalvo et al., 2011).

Tras determinar que Coq7p es una fosfoproteína y que su fosforilación disminuye su actividad en la síntesis de CoQ, se planteó cuál era la fosfatasa que desfosforila a esta proteína. Recientemente se ha demostrado que la fosfatasa Ptc7p desfosforila *in vitro* e *in vivo* a Coq7p y que su expresión induce la síntesis de CoQ a través de la activación de Coq7p (Martin-Montalvo et al., 2013).

Por todo esto, podemos considerar que la fosforilación juega un importante papel en la regulación de la síntesis de CoQ en *S. cerevisiae* y que posiblemente no sólo se ciña a Coq7p, sino que afecte a otras proteínas como puede ser Coq4p.

4. El gen *COQ4*

4.1. Características del gen *COQ4*

El gen *COQ4* fue descrito por primera vez como uno de los genes implicados en la síntesis de CoQ en *S. cerevisiae* (Belogrudov et al., 2001). Este gen nuclear codifica para una proteína de 335 aminoácidos que se encuentra asociada a la cara matricial de la membrana interna mitocondrial. Aunque es esencial para la síntesis de CoQ en eucariotas su función sigue siendo desconocida. De acuerdo con su papel en la síntesis de CoQ, los niveles de ARNm de *COQ4* aumentan cuando la levadura crece en un medio con glicerol como fuente de carbono, es decir, cuando es obligada a respirar (Belogrudov et al., 2001). Al analizar su secuencia no se encuentra homología con otras proteínas ni dominios que indiquen que posee actividad enzimática. Existen genes homólogos de *COQ4* en todos los genomas de eucariotas y en algunas proteobacterias y cianobacterias, algunas de las cuales no contienen CoQ. Comparando varias de estas secuencias, la proteína Coq4 parece contener un dominio catalítico de unión a zinc altamente conservado que ha sido propuesto como una especie de sensor del estado redox de la mitocondria (Marbois et al., 2009).

El gen *COQ4* de humanos codifica para una proteína de 265 aminoácidos que posee un 39% de identidad y un 55% de similitud con la proteína de levadura, se localiza en la mitocondria y está funcionalmente conservado ya que el gen *COQ4* humano es capaz de restablecer los niveles de CoQ₆ y la capacidad de respirar en un mutante nulo de levadura (Casarin et al., 2008). Por análisis de secuencia parece ser una proteína soluble no anclada a la membrana. Al analizar la secuencia promotora se observa que

carece de una caja TATA como tal y que presenta sitios de unión para factores de transcripción, algunos de ellos relacionados con el metabolismo respiratorio como NURF1 y Hif-1. Se expresa en todos los tejidos, aunque la expresión más alta se observa en el hígado, el riñón y el páncreas (Casarin et al., 2008).

Hasta ahora sólo se ha resuelto la estructura tridimensional de una proteína homóloga a Coq4p procedente de la cianobacteria *Nostoc sp.*PCC7120 mediante cristalografía de rayos X. Junto con la proteína co-cristalizó una molécula de geranil-geranil monofosfato en una especie de bolsillo de unión y un ión magnesio en el sitio de unión a zinc. Basándose en esta estructura se generó un modelo tridimensional de la proteína de *S. cerevisiae* (Rea et al., 2010). Debido a su papel fundamental en la síntesis de CoQ y a que su ausencia afecta a los niveles de otras proteínas de la síntesis de CoQ, Coq4p ha sido propuesta como una especie de anclaje que permite la formación y estabilización de un complejo de síntesis multiproteico necesario para la síntesis de CoQ (Marbois et al., 2009). El hecho de que co-cristalizara con una molécula de geranil-geranil monofosfato apoya la idea de que Coq4p podría actuar como un anclaje para la cola poliisoprenoide del HHB y sobre esto actuarían el resto de proteínas Coq modificando el anillo (Rea et al., 2010), constituyéndose como un elemento nucleador del complejo.

4.2. El gen *COQ4* en la deficiencia de CoQ₁₀

Como se ha dicho anteriormente, existen numerosas enfermedades mitocondriales asociadas a deficiencia primaria de CoQ, es decir, debida a una mutación en uno de los genes de la síntesis de CoQ. En los últimos años se han encontrado mutaciones en *COQ4* en pacientes de este tipo, lo que ha hecho que aumente el interés por conocer la función de este gen, hasta ahora desconocido.

En un estudio llevado a cabo en nuestro laboratorio en el que se analizaron las secuencias de los genes COQ en distintos pacientes con deficiencia de CoQ₁₀, se encontró un paciente que contenía una mutación puntual en *COQ4* (G483C) en heterocigosis que producía un cambio de aminoácido, glutámico por aspártico (E161D).

Análisis llevados a cabo en fibroblastos del paciente mostraron que, además del déficit de CoQ, la actividad del complejo II+III estaba alterada y mejoraba al suplementar las células con CoQ. Los fibroblastos del padre del paciente, también portador de la mutación y con una deficiencia de CoQ, presentaban elevados niveles de lactato y unas características propia de células con deficiencia de CoQ: prolongaciones más cortas, forma irregular y menor tasa de crecimiento. Las características morfológicas mejoraron tras la adición de CoQ (Jimenez-Ortega, 2009). Partiendo de esta base se realizaron experimentos de complementación genómico-funcional en la levadura *S. cerevisiae* para la caracterización del gen humano y de la mutación E161D. Tras comprobar que el gen humano era capaz de complementar en una levadura delecionada para *COQ4* (Casarin et al., 2008), se llevó a cabo la complementación con el alelo mutante. Los resultados demostraron que la mutación E161D da lugar a una proteína incapaz de restaurar los niveles de CoQ en la levadura y que ejerce un mecanismo de dominancia negativa sobre la proteína silvestre en levaduras diploides y, por tanto, podría ser la causa de la deficiencia de CoQ en el paciente (Jimenez-Ortega, 2009).

Recientemente, se ha publicado el caso de un paciente con una delección en el cromosoma 9 que incluye el gen *COQ4*. El paciente presentaba al nacer características dismórficas, un pequeño defecto septal ventricular, debilidad, hipotonía e hiporreactividad, retraso del crecimiento. En los meses siguientes mostró poco crecimiento, la hipotonía y la debilidad empeoraron y fue hospitalizado varias veces con infecciones respiratorias severas. A la edad de tres años presentaba un retraso mental moderado, era incapaz de andar y hablar y presentaba una hipotonía y una debilidad severas. Análisis realizados a los fibroblastos de este paciente mostraron que presentaba un 48% de expresión del gen *COQ4* con respecto al control y una actividad del complejo II+III de la cadena respiratoria reducida. Los niveles de CoQ eran del 43% y la tasa de síntesis del 44% medido como incorporación de para-hidroxibenzoato, lo que confirmó la deficiencia de CoQ. Se realizó el mismo estudio en células HeLa con un 50% de silenciamiento de *COQ4* y se observó el mismo efecto, los valores de CoQ₁₀ se reducían a la mitad (54%). Por otro lado, levaduras diploides con un solo alelo de *COQ4* también presentan niveles de CoQ disminuidos, fenotipo que es rescatado al

transformarlas con el gen *COQ4*. Teniendo en cuenta todos estos resultados se pudo concluir que la haploinsuficiencia de *COQ4* causa una deficiencia de CoQ. Dado que la suplementación con CoQ₁₀ ha tenido resultados satisfactorios en algunos casos de deficiencia, se utilizó como tratamiento tanto en el paciente como en los fibroblastos con CoQ₁₀. Tras la suplementación se observó una mejoría del fenotipo del paciente como de los fibroblastos. En el paciente, tras tres meses de tratamiento con 30 mg/kg al día de ubiquinona, se observó una mejora del tono muscular y la fuerza. Tras cinco semanas pudo andar por sí solo y hubo una mejora general en su atención e interacción social. La mejoría se mantuvo durante tres años hasta que se redujo la dosis a 2 mg/kg por día y aparecieron de nuevo debilidad y mialgias. Al volver a la dosis inicial los síntomas remitieron tras una semana. A día de hoy, el tratamiento consiste en 15 mg/kg al día de ubiquinol, la forma reducida del CoQ₁₀ y el paciente responde correctamente (Salviati et al., 2012).

Teniendo en cuenta las consecuencias que conlleva la falta de esta proteína y que es esencial para la síntesis de CoQ, parece importante conocer la función de Coq4p y ese es el objetivo principal de esta tesis doctoral. Con la información de la que disponemos podemos considerar a Coq4p como una proteína esencial para la formación del complejo de síntesis, no sólo como proteína estructural, sino como responsable del correcto ensamblaje de este. Prueba de ello es el hecho de que la presencia de Coq4p es necesaria para mantener los niveles de otras proteínas de la síntesis como Coq3p, Coq6p, Coq7p y Coq9p. (Belogradov et al., 2001; Marbois et al., 2009) y su capacidad para unirse a moléculas de naturaleza isoprenoide (Rea et al., 2010) que lo hacen un buen candidato para servir de anclaje a la cola isoprenoide del HHB sintetizado por Coq1p y Coq2p. Debido a que la regulación por fosforilación en la mitocondria es algo frecuente y que se ha demostrado que la actividad de algunas de las proteínas Coq es regulada mediante fosforilación, nuestra hipótesis es que Coq4p podría ser también una fosfoproteína y que su estado fosforilado sirviera como punto de control en la formación del complejo y, por tanto, en la síntesis de CoQ.

OBJETIVOS

OBJETIVOS:

El objetivo principal de esta tesis doctoral es determinar la función de Coq4p en la formación del complejo de síntesis de CoQ de *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Estudio del complejo de síntesis de CoQ mediante experimentos de sobreexpresión en los distintos mutantes *coq*.
2. Caracterización de Coq4p como una fosfoproteína mediante el análisis de su secuencia y la modificación de aminoácidos susceptible de ser fosforilados.
3. Análisis *in vivo* de los efectos de las modificaciones de Coq4p en la levadura.
4. Determinación de la implicación de Coq4p en la estabilidad de los complejos respiratorios.
5. Comparación de los mutantes de *coq4* deficientes en la síntesis de CoQ con las versiones no fosforilables de Coq4p

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estirpes

Para las transformaciones y el mantenimiento de plásmidos se utilizó la estirpe de *Escherichia coli* (DH5 α) (F⁻, ϕ 80d*lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*) U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (*rk*⁻, *mk*⁺), *phoA*, *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*).

En el protocolo de purificación de proteínas recombinantes se utilizó la estirpe de bacterias BL21 (DE3) pLys S (F⁻ *ompT*, *hsdS_B* (*r_B-m_B*⁻), *dcm*, *gal*, λ (DE3) pLysS (Cam_r)).

La levadura utilizada en todos los experimentos fue la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Las distintas estirpes se muestran en el anexo 1.

2. Medios de cultivo

2.1. Medios de bacterias

Las bacterias se cultivaron en medio Luria Broth (LB) que contiene 1% triptona, 0.5% extracto de levadura y 1% NaCl. En caso de añadir antibiótico se añadió al medio de cultivo a una concentración final de 10 μ g/ml para seleccionar las bacterias con construcciones que contenían la resistencia al antibiótico (ampicilina, cloranfenicol, higromicina o kanamicina).

2.2. Medios de levaduras

-Medios ricos:

Compuestos por extracto de levadura al 1% y peptona al 2% (medios YP). A esta base se le añade la fuente de carbono, que puede ser fermentable como la glucosa al 2% (YPD) o una fuente de carbono no fermentable como es el glicerol (YPG) al 3%.

-Medios selectivos:

En estos se incluye YNB 1,7 g/l y se añaden 1,73g/l de un suplemento de aminoácidos y nucleótidos utilizado para la selección de las estirpes de levadura. Finalmente se ajusta el pH a 6.

Para preparar los anteriores medios en placa se añade agar al 2%.

3. Diseño de cebadores

Para el diseño de cebadores con los que se clonaron todas las versiones de *COQ4* y para la generación del doble mutante se utilizó el programa informático Primer Premier 5.00 (Biosoft International). Los cebadores utilizados para la mutagénesis dirigida se diseñaron mediante el programa QuikChange® Primer Design Program (Agilent Technologies). Los cebadores utilizados se recogen en el anexo 2.

4. Clonación de genes en vectores de expresión

Los plásmidos en copia simple pRS316 que contenían los genes *COQ* son procedentes del laboratorio de Cathy Clarke (Anexo 3). A partir de estos plásmidos los distintos genes *COQ* fueron clonados en el plásmido multicopia pRS426 (en el caso de *COQ8* también en el plásmido pRS425) mediante digestión con distintas enzimas de restricción y ligación.

El gen *COQ4* fue clonado en los vectores pYES2.1 TOPO TA (Invitrogen) y pET28a (Novagen) para su expresión en levaduras y bacterias respectivamente. Para ello el gen se amplificó mediante PCR a partir de genómico de levadura y los cebadores FyCOQ4_BamHI y yCOQ4NS_R (Tabla 2). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler. El programa que se utilizó para amplificar los fragmentos se muestra en la tabla 1.

Ciclo	Repeticiones	Paso	Temperatura (C°)	Tiempo (s)
1	1	Desnaturalización	95	300
2	24	Desnaturalización	95	45
		Alineamiento	62 (Δ -0,5°C/min)	45
		Extensión	72	60s/Kb
3	6	Desnaturalización	95	45
		Alineamiento	50	45
		Extensión	72	60s/Kb
4	1	Extensión	72	600

Tabla 4. Programa de PCR.

Los fragmentos de PCR se sometieron a electroforesis de ADN en geles de agarosa (1%) en TBE con bromuro de etidio. Tras su purificación mediante el kit SpinClean™ Extraction (Mbiotech), los productos se clonaron en el vector comercial pYES2.1 TOPO TA (Invitrogen) en fase con el epítipo V5 en el extremo C-terminal. Una vez clonado en fase con V5 se amplificó todo el gen y el epítipo mediante PCR añadiendo las dianas de corte para las enzimas de restricción BamHI y XhoI (Fermentas) utilizando los cebadores COQ4NOATG_F y V5XhoI_R (Anexo 2) para su posterior clonación en el vector pET28(a) (Novagen) en fase con el epítipo 6xHis.

Todos los plásmidos utilizados se recogen en el anexo 3.

5. Análisis bioinformático de secuencias de proteínas

Se utilizó el programa GPS 2.1 (Xue et al., 2008) para determinar posibles sitios de fosforilación en la secuencia de Coq4p de *S. cerevisiae*. Para determinar que aminoácidos estaban conservados se llevó a cabo el alineamiento de las secuencias de proteína utilizando el programa AlignX (Vector NTI Advance 11.5.1, Invitrogen). El programa informático RasMol 2.7.5.2 (RasWin Molecular Graphics) fue utilizado para visualizar la estructura 3D de Coq4p y para marcar los aminoácidos de interés.

6. Purificación de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de un cultivo de levaduras de 5 mL de YPD crecido durante toda la noche. Las células se recogen por centrifugación y se lavaron con agua destilada. Las células se resuspenden en 200 μ L de tampón de rotura (2% (v/v) Tritón X-100, 1% (v/v) SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris Cl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) al que se añaden 0,3 g de esferas de vidrio y 200 μ L de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Se agita en el vórtex durante 3 minutos. Se añaden 200 μ L de tampón TE y se agita mediante vórtex. Se centrifuga 5 minutos a 13000 g y se transfiere la capa acuosa a un tubo limpio. Se añade 1 mL de etanol 100% y se mezcla por inversión. Se centrifuga 3 minutos a 13000 x g, se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet en 0,4 mL de tampón TE. Para eliminar una posible contaminación con ARN se añade 30 μ g de ARNasa A y se incuba 5 minutos a 37°C. A continuación se añaden 10 μ L de acetato amónico 4 M y 1 mL de etanol 100% y se mezcla por inversión. Se centrifuga 3 minutos a 13000 g, se descarta el sobrenadante y se deja secar el pellet. Se resuspende en 100 μ L de tampón TE.

7. Mutagénesis dirigida

Para generar las distintas versiones de *COQ4* por mutagénesis dirigida se utilizó el kit comercial QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) utilizando como ADN molde los plásmidos con las versiones silvestres de *COQ4*.

8. Secuenciación

Todas las construcciones fueron secuenciadas por Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg, Alemania).

9. Transformación bacterias

Para la obtención de bacterias competentes se utilizó el método del CaCl_2 . Los cultivos a una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,5 se centrifugan, se resuspenden en 50 mM de CaCl_2 frío y se incuban en hielo durante 1 h. Tras centrifugar, se resuspende el pellet en CaCl_2 a 0,125

DO_{600nm}/mL. Se toman 50 µl de bacterias competentes a las que se añade el ADN plasmídico y se incuban durante 30 minutos en hielo. Posteriormente se someten a un choque térmico de 42°C durante 2 minutos seguido de 5 minutos de incubación en hielo. Se añadió 1 mL de medio LB y se incubaron a 37°C durante 30 min en agitación. Finalmente se sembraron placas de medio selectivo.

10. Sobreexpresión de proteínas en bacterias:

Una vez transformada la estirpe de bacterias BL21 (DE3) pLys S con las distintas versiones del gen *COQ4* en el plásmido pET28a se inocula un cultivo de medio LB con kanamicina y cloranfenicol y se deja crecer a 37°C hasta que alcance una DO_{600nm} de 0,5 UA/mL. A continuación se añade IPTG 1 mM como inductor y etanol 2 % (v/v). La inducción se lleva a cabo durante 4-6 horas a 37°C. Posteriormente las células se recogen por centrifugación a 5000 g durante 15 minutos a 4°C.

11. Purificación de proteínas recombinantes en bacterias

Tras la inducción, una vez que hemos recogido el pellet de bacterias se resuspende en 25 mL de buffer de lisis (20mM K-MES pH6, 150mM NaCl, 0,45% CHAPS (p/v)) por litro de cultivo y se le añade PMSF 1mM, cocktail inhibidor de proteasas *Complete EDTA-free* (Roche) y 0,1 mg de ADNasa. Las células se rompen por sonicación y se centrifugan a 48000 g durante 20 minutos a 4°C para eliminar restos celulares. Se toma el sobrenadante.

Una vez que tenemos el sobrenadante llevamos a cabo la purificación mediante el epítipo de histidina para la cual los hacemos pasar a través de una columna que contiene 2 mL de resina HIS-Select® HF Nickel Affinity Gel (Sigma). Se lava la columna con 6 mL de buffer de lisis con imidazol 10 mM. Por último se eluyen la proteína con 2 mL de buffer de lisis con imidazol 500 mM.

Para la purificación mediante el epítipo V5 medimos añadimos 500 µg de proteína a 25 µL de bolas Anti-V5 Agarose Affinity Gel (Sigma-Aldrich). Se incuba a 4°C durante 16 horas y se lavan las bolitas 4 veces con PBS con Tween-20 al 0,05%.

12. Sobreexpresión de proteínas recombinantes en levadura

Se cultivan las levaduras en medio líquido selectivo SDc-ura 2% glucosa durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugan los cultivos y se resuspenden en el mismo volumen de medio SDc-ura 2% galactosa para inducir la expresión del gen y se cultivan 4h a 30°C en agitación.

13. Cuantificación de proteínas

La determinación de proteínas se llevó a cabo mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello se utiliza una cubeta de espectrofotometría a la que se añaden 50 µl de NaOH 1 M, 20 µl de muestra (la cual se diluye en caso de que haya demasiada cantidad de proteína) y 1 ml del reactivo de Bradford Bio-Rad Protein Assay (Biorad). La mezcla se incuba 5 minutos a temperatura ambiente y se cuantifica la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. La cantidad de proteína se calcula a partir de una recta patrón que contiene cantidades conocidas de inmunoglobulina G (0-10 µg).

14. Ensayo de fosforilación in vitro

A la muestra de proteína, en este caso la proteína purificada unida a las bolitas con anti-V5, se le añade 1 µg de proteína quinasa C comercial (Merck Millipore) y 0,1 µCi de [γ -³²P]ATP (Perkin Elmer) en buffer quinasa compuesto por 50 mM Tris HCl, 25 mM β -glicerol fosfato, 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 1 mM ditioneitol. Todo esto se incuba a 30°C durante 30 minutos. Posteriormente se le añade Electrophoresis Sample Buffer 2x (Santa Cruz Biotech) a la muestra y se calienta 10 minutos a 95°C. Se centrifuga y el sobrenadante se carga en un gel SDS-PAGE al 12,5% de acrilamida. Se seca el gel y se determina la fosforilación por exposición a una pantalla Phosphorimager y midiendo la radiactividad acumulada mediante Typhoon 9410 Scanner. La intensidad de las bandas se cuantificó con el programa de imagen Image Lab TM (Bio Rad).

15. Transformación de levaduras

Se inocula un cultivo de levaduras en medio rico (YPD) a una DO_{660nm} de 0,3 a partir de un preinóculo del día anterior en el mismo medio y se cultivan hasta que alcancen una DO_{600nm} de 0,8- 0,9. Se centrifugan las levaduras (2500 g, 5 minutos) y se lavan con agua estéril. El pellet de células se resuspende en 500µl de acetato de litio 0,1 M y se incuban 5 minutos a temperatura ambiente. Para cada reacción de transformación se reparten 100 µl de células en viales estériles. Se centrifuga 1 minuto a máxima velocidad y se elimina el sobrenadante.

A continuación se añaden los siguientes componentes en este orden:

- 240 µl de PEG 50%
- 36 µl de acetato de litio 1 M
- 10 µl de ADNss 10mg/ml (*Salmon Testes DNA*, Sigma)
- 5 µl del plásmido
- 35 µl de agua destilada estéril.

Se incuban a 30°C durante 30 minutos seguido de un choque térmico a 42°C durante 30. A continuación, las células se resuspenden en 1 ml de medio rico (YPD), incubándose durante 2 horas a 30°C. Por último, se centrifugan las levaduras 5 minutos a 2000 g, se retira el sobrenadante y se resuspenden las células en 100 µl de agua estéril, sembrándose el contenido en placas de medio selectivo. Se incuban a 30°C hasta la aparición de colonias (48-72 h).

16. Generación de un doble mutante *coq4/coq7* en levadura

La generación del doble mutante se llevó a cabo sustituyendo por recombinación homóloga el gen *COQ4* de una levadura *coq7* mutante por un cassette de selección por higromicina. Para ello se amplificó por PCR el gen de resistencia a higromicina a partir del plásmido pUG27 (Gueldener et al., 2002) añadiendo a los extremos regiones homólogas al gen *COQ4* utilizando los cebadores DM-Q4.1S y DM-Q4.1A (ver anexo 2). El fragmento de PCR se purificó utilizando el kit SpinClean TM Extraction (Mbiotech) y

la levadura mutante *coq7* fue transformada con este fragmento (ver protocolo de transformación de levaduras).

17. Purificación de esferoplastos y mitocondrias

El método utilizado para purificar la mitocondria fue desarrollado por Glick (Glick and Pon, 1995). Se recoge un cultivo de levaduras por centrifugación a 2000 g durante 5 minutos. El pellet se lava con agua destilada y se toma su peso fresco en una balanza de precisión. El pellet se resuspende en 10 ml de tampón A (Tris-SO₄ 100 mM pH 9,4 y con ditioneitol (DTT) 10 mM) y se incuba durante 30 minutos con agitación suave a 30°C. El DTT reduce los puentes disulfuro de las manoproteínas que forman la pared celular y facilita la posterior acción de la zymoliasa. Tras la incubación, se centrifuga a 2000 g durante 5 minutos y el pellet se resuspende en 2 ml de tampón B (fosfato potásico 20 mM pH 7,4 y sorbitol 1,2 M) por gramos de peso fresco y se le añade 2,5 mg de zymoliasa 20T por gramo de peso fresco (Seikagaku Corporation). Todo esto se incubó durante 60-90 minutos a 30°C con agitación. Este paso consigue eliminar la pared celular de las levaduras y obtener los esferoplastos. Una vez digerida la pared celular, la suspensión se centrifugó a 4000 g 5 minutos. A partir de este momento todos los pasos se realizan manteniendo en frío las muestras. El pellet se resuspende en 10 ml de tampón C (K-MES pH6 y sorbitol 0,6 M) al que se le añade PMSF 1 mM y cocktail inhibidor de proteasas *Complete EDTA-free* (Roche). A continuación se introduce todo en un homogenizador Dounce (vidrio-vidrio) y se rompen las células mediante 40 golpes de homogenizador. La muestra se centrifuga a 2000 g durante 5 minutos a 4°C para eliminar restos de componentes celulares. El sobrenadante se centrifuga a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. Tras la centrifugación la pella está formada por una fracción de membrana enriquecida en mitocondria cruda. Estos dos últimos pasos de centrifugación se repiten lavando con 12 ml de tampón C para aumentar la pureza del extracto de mitocondrias. Por último se resuspende en un volumen de 0,5 ml de tampón C.

18. Ensayo de viabilidad en medio YPG e YPD

Para ver el crecimiento de las distintas estirpes en medio YPG e YPD tanto en placa como en un medio líquido se crecen las levaduras en medio líquido selectivo al 2% de glucosa durante toda la noche. Al día siguiente, si es necesario inducir la expresión de la proteína, se centrifugan los cultivos y se resuspenden en el mismo volumen de medio SDc-ura 2% galactosa para inducir la expresión del gen y se cultivan 4h a 30°C en agitación. A continuación se mide la DO_{660nm} y se inoculan cultivos de YPG e YPD líquido a 0,1 UA/mL. A partir de este punto se mide la DO_{600nm} de los cultivos durante al menos 5 días hasta que llegan a la fase estacionaria

Para el crecimiento en placa se hace una dilución del cultivo para que quede a 0,5 UA/mL y se hacen 3 diluciones seriadas 1/10. De cada dilución se siembran 5 μ L en la placa formando *spots*. Las placas se incuban a 30°C durante 3 días.

19. Extracción y cuantificación de compuestos quinónicos en mitocondria de levadura

La extracción se realiza a partir de 0,5 mg de proteína de mitocondria. La proteína se resuspende en un volumen de PBS hasta llegar a un volumen total de 1 mL. Se añaden 500 μ l de SDS al 2%. Para saber cuál es el rendimiento de la extracción y cuál es la cantidad real de CoQ₆ que hay en la muestra, se añaden 500 ng de CoQ₉ como estándar interno. La muestra se agita en un vórtex a máxima velocidad durante 1 minuto. A continuación se añaden 2 mL de una mezcla de etanol/isopropanol en proporción 1:19 y se agita en el vórtex durante un minuto. Se añaden 5 ml de hexano. Se vuelve agitar en el vórtex y se centrifuga durante 5 minutos a 1000 g. Este paso separa las fases etanol/hexano, y posteriormente se recoge la fase superior. Este proceso se repite 3 veces para extraer los lípidos presentes en el extracto. El hexano se evapora en un rotavapor y por último, el residuo que queda se resuspende en 1 ml de etanol, se seca en un *speed-vac* y se resuspende en 0,2 ml de etanol.

Los extractos lipídicos se utilizaron para separar y cuantificar el CoQ₆ y DMQ₆ oxidado mediante un sistema cromatográfico compuesto por bombas de HPLC del modelo 126

de (Beckman Coulter), una columna de fase reversa Kromasil C-18 termost atizada a 40°C con un horno de columna, un detector ultravioleta en serie de tipo Diode Array modelo 166 (Beckman Coulter) y un detector electroquímico (ESA Coulochem III) compuesto de una célula guarda situada antes del inyector automático configurado a +500 mV en serie tras el inyector automático, para oxidar la mezcla muestra-fase móvil. Se utilizan como fase móvil una mezcla de dos soluciones distintas. La solución A se compone de metanol 980 ml y 20 ml de una solución de acetato amónico 1 M en agua con pH 4.4 (ajustado con ácido acético glacial). La solución B se compone de propanol 980 ml y 20 ml de una solución de acetato amónico 1 M en agua con pH 4.4 (ajustado con ácido acético glacial). La mezcla se compone de 60 % de solución A y 40% de solución B. El método es isocrático y tiene una duración de 13 minutos. La separación se realiza todo el tiempo a un flujo de 1 ml/min y a 40°C en el horno de columna (columna tipo C18 3,5 μ m de tamaño de partícula y 15 cm de longitud). La presión normal del sistema es 2,4 kpsi. Las condiciones electroquímicas son todo el tiempo de 500 mV para la célula guarda, mientras que para los canales analíticos serán: -500 mV para el CH1 y +500mV para el CH2, ambos con 1 uA de fondo de escala. En estas condiciones la corriente de fondo normal es de 0,5 mV para la célula guarda, y 53,62 mV para el CH2. El sistema se controla mediante el software cromatográfico 32 Karat 5.0 de Beckman Coulter. El CoQ₆ y CoQ₉ comerciales (oxidados) se usaron como estándares externos.

20. Medida del ratio CoQ reducido/oxidado

En la medida del ratio del CoQ re duxido/oxidado es importante realizar la medida mediante HPLC inmediatamente después de realizar la extracción y esta debe ser lo más rápida posible. Para ello, se tomaron 200 μ g de una fracción enriquecida en mitocondria y se le añadió agua destilada hasta un volumen de 100 μ L. Se añade β -mercaptoetanol 1,6 mM (para evitar que el CoQ₆ se oxide durante el proceso de extracción), 300 μ L de isopropanol y 30 μ L de una mezcla 5 μ M de CoQ₉ y CoQ₁₀ como estándar interno. Se agita en el vórtex y se deja 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga 1 minuto a 13000 g y se toma el sobrenadante para ser analizado por HPLC igual que en el caso de la medida de compuesto quinónicos.

21. Medida de las actividades de la cadena respiratoria mitocondrial

21.1. Actividad del complejo I (NADH-DCIP reductasa)

En la determinación de la actividad de este complejo se utilizó el método de Velázquez (Velazquez and Pardo, 2001) con agitación magnética. Ésta actividad determina la reducción de diclorofenol-indofenol (DCIP) mediante la caída de densidad óptica a 600 nm. A 1 mL del tampón de reacción (fosfato sódico 40 mM pH 7,4) se añaden 50 µg de mitocondria. La reacción se inicia añadiendo DCIP 60 µM sin NADH. Tras un minuto de incubación, se añade NADH 200 µM. La actividad NADH-DCIP específica se determina restando la pendiente del rango lineal antes de añadir el NADH a la pendiente después de la adición de éste, usando un coeficiente de extinción molar a 600 nm de $14,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Todos los ensayos fueron realizados al menos por triplicado.

21.2. Actividad del complejo III (decilubiquinona-citocromo c reductasa)

La actividad se determina midiendo la reducción del citocromo c mediante el aumento de la densidad óptica a 550 nm. Se añaden 50 µg de mitocondria a 1 ml de tampón fosfato sódico 40 mM pH 7,4 a 30°C con agitación magnética. La reacción se inicia con la adición de citocromo c 60 µM y, tras un minuto de incubación, se añade decilubiquinona 50µM. La actividad específica se determina restando la pendiente del rango lineal inicial antes de la adición de decilubiquinona a la pendiente tras la adición de la misma, usando un coeficiente de extinción molar a 550 nm de $18,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, y en presencia y ausencia de antimicina.

21.3. Actividad del complejo I+III (NADH-citocromo c reductasa)

La actividad se determina midiendo la reducción del citocromo c mediante el aumento de la densidad óptica a 550 nm. Se añaden 50 µg de mitocondria a 1 ml de tampón de ensayo (fosfato sódico 40 mM pH 7,4) y cianuro potásico 250 µM a 30°C con agitación magnética. En este caso se la reacción se inicia con la adición de citocromo c 60 µM y, tras un minuto de incubación, se le añade NADH 160 µM. La actividad específica se determina restando la pendiente del rango lineal inicial antes de la adición de NADH menos la pendiente tras la adición del mismo, usando un coeficiente de extinción

molar a 550 nm de $18,5 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado, y en presencia y ausencia de antimicina.

22. Consumo de oxígeno

Para la determinación del consumo de oxígeno en levaduras se utilizó un electrodo de Clarke (YSI incorporated 5300A Biological Oxygen Monitor). De cada cultivo se toman 3 mL a 1 UA/mL a 660nm. Se monitoriza la señal durante 5-10 minutos y posteriormente se añade KCN 1 mM, que inhibe a complejo IV mitocondrial, para asegurarnos de que lo que se mide es respiración mitocondrial. Mediante el programa System Gold de Beckman se registra la señal del electrodo y se calculan las pendientes correspondientes al consumo de oxígeno en el rango lineal antes y después de la adición del cianuro. La medida del consumo de oxígeno tras la adición del cianuro se resta al dato obtenido sin cianuro. Finalmente se determina el consumo de oxígeno estableciendo que a 30°C la concentración de oxígeno en el medio es de 5,48 μ l de O₂/ml.

23. Medida de la producción de radicales libres

23.1. Medida de la producción de radicales libres en células enteras

La determinación de la producción de radicales en células enteras se llevó a cabo por citometría de flujo. Las levaduras se cultivaron en medio selectivo SDc-ura 2% de glucosa. Se midió la DO_{660nm} del cultivo, se lavaron las células y se resuspendieron en PBS a una concentración final de $2\cdot 10^6$ células/mL. Las células fueron incubadas con hidroetidio 5 μ M, MitoSox 2,5 μ M y 123-dihidrorodamina 5 μ M durante 30 minutos a 30°C. El hidroetidio nos da una idea del estrés oxidativo general en la célula. El MitoSox y la 123-dihidrorodamina además nos dan información sobre el estrés oxidativo en la mitocondria. La detección se llevó a cabo utilizando un citómetro de flujo Coulter Epics XL, excitando a una longitud de onda de 488 nm con un láser de argón y detectando la fluorescencia emitida a 590 nm (FL3) para el caso del hidroetidio y el MitoSox y a 525 nm (FL1) en el caso de la 123-dihidrorodamina. La presión del fluido fue ajustada hasta la detección de 200 eventos por segundo aproximadamente.

23.2. Medida de la producción de superóxido en la mitocondria

En la cadena respiratoria mitocondrial, el complejo III cede los electrones al citocromo *c*. Sin embargo, si la molécula de citocromo *c* está acetilada, ésta no puede ser reducida por el complejo III, sólo puede ser reducida en presencia de radicales libres como el ion superóxido. Por tanto, podemos considerar la medida de la reducción del citocromo *c* acetilado como una medida indirecta de la producción de superóxido. Para ello se añade a una cubeta de espectrofotómetro tampón fosfato sódico 40 mM pH 7,4, 250 μ M de cianuro potásico, 24 μ M de citocromo *c* acetilado y 50 μ g de proteína de mitocondria y se incuba durante 1 minuto. A continuación se añaden NADH 200 μ M y succinato 40 mM. La medida de citocromo *c* acetilado reducido se determina restando la pendiente del rango lineal inicial antes de la adición de NADH menos la pendiente tras la adición del mismo, usando un coeficiente de extinción molar a 550 nm de 18,5 mM⁻¹cm⁻¹. Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado.

24. Solubilización de mitocondria de levadura

Se resuspenden 400 μ g de mitocondria en 40 μ L buffer de solubilización (HEPES pH 7,4 30mM, acetato potásico 150 mM, glicerol 10%, PMSF 1mM) al que se le añade digitonina (4 mg/ mg proteína). Las muestras se dejan 30 minutos en hielo y se centrifugaron 2 minutos a 13000 g. Se descarta el pellet y se toma el sobrenadante.

25. Inmunodetección de proteínas

A las muestras de proteínas se les añade Electrophoresis Sample Buffer 2x (Santa Cruz Biotech) y se somete a electroforesis desnaturizante en SDS (SDS-PAGE) en geles de acrilamida al 12,5% y 1,5 mm de grosor utilizando el sistema MiniProtean III (BioRad) con Tris/Glycine/SDS Buffer (Bio Rad). Posteriormente las proteínas son transferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL; Ge Healthcare), con el sistema semiseco Trans-Blot SD Transfer Cell (Bio-Rad) y el tampón Tris / Glicine Buffer (Bio Rad). Como control de la transferencia y como control de carga se tiñe la membrana con una solución de Rojo Ponceau al 0,5% en ácido acético al 1%. El bloqueo de la membrana se lleva a cabo con tampón TTBS (Tris 20 mM pH 7.4, NaCl 150 mM y 0.05 % de Tween-

20) con 5% p/v de Blotting Grade Blocker not-fat dry milk (BioRad). A continuación, se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C y 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con HRP. Después de cada anticuerpo se realizan tres lavados de la membrana con TTBS.

Para el revelado de la membrana se utilizó el reactivo Luminata Classico Western HRP Substrate (Millipore) y el equipo Molecular Imager ChemiDoc TM XRS (Biorad). La cuantificación de las bandas se realizó mediante el programa de análisis de imagen Image Lab™ (Bio Rad).

Anticuerpo primario	Tamaño de la proteína que reconoce (kDa)	Dilución	Anticuerpo secundario
Anti-yCOQ4 (Abyntek)	39	1:5000	Conejo
Anti-yCOQ3 (Abyntek)	36	1:5000	Conejo
Anti-yCOQ8 (Abyntek)		1:1000	Conejo

Tabla 5. Anticuerpos.

26. Análisis de complejos de proteínas mediante electroforesis en condiciones nativas

Las muestras de mitocondria solubilizada se resuspenden en 5 µL de rojo Ponceau 0,1% en glicerol 50% (p/v) y posteriormente se añaden 4 µL de azul coomassie al 5% en ácido aminocapróico 0,5 M. Las muestras se someten a electroforesis en condiciones nativas en geles en gradiente de acrilamida 3-13%. Como tampón ánodo se utilizó 25mM imidazol-HCl pH 7. Como tampón cátodo se utilizó Tricina 50mM pH 7, Imidazol 7,5 mM pH 7 y azul coomassie 0,02%. La electroforesis se realizó en un equipo SE600X Chroma Deluxe Dual Cooled Vertical Unit (Hoefer). Para visualizar las bandas teñidas con coomassie se utilizó solución de destañido de coomassie (10% de acético y 40 % de metanol).

27. Tinción de plata

Tras realizar la electroforesis el gel se incuba durante toda la noche en solución de fijación (50% metanol, 12% acético y 0,0185% formaldehído). Se lava 3 veces durante 20 minutos con una solución de etanol al 50% y se le da un pretratamiento con tiosulfato sódico 0,02% durante un minuto. Se lava tres veces con agua destilada y se incuba en la solución de impregnación de plata (nitrato de plata 0,1% y formaldehído 0,0278%) durante 20 minutos. A continuación se lava 3 veces con agua destilada y se incuba en solución de desteñido (carbonato sódico 3%, tiosulfato sódico 0,0002% y formaldehído 0,0093%) en oscuridad hasta que aparezcan las bandas de proteína. Se lava la membrana 2 veces con agua destilada y se para la reacción con la solución de bloqueo (metanol 50% y ácido acético 12%) incubándolo durante 10 minutos. Posteriormente se pasa el gel a una solución de metanol al 50% durante 20 minutos y por último a una de metanol al 5%.

Nombre	Genotipo	Fuente
BY4741	MATa; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0	Euroscarf
BY4741 <i>coq3</i>	Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YOL096c::kanMX4	Euroscarf
BY4741 <i>coq4</i>	MATa; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YDR204w::kanMX4	Euroscarf
BY4741 <i>coq5</i>	MATa; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YML110c::kanMX4	Euroscarf
BY4741 <i>coq6</i>	Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YGR255c::kanMX4	Euroscarf
BY4741 <i>coq7</i>	Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YOR125c::kanMX4	Euroscarf
BY4741 <i>coq9</i>	Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YLR201c::kanMX4	Euroscarf
CEN <i>abc1</i>	MATa, his3-Δ1; leu2-3,112; trp1-289; ura3-52; MAL2-8c; MAL3; SUC2; abc1::HIS3	(Hsu et al., 2000)
BY4741 <i>coq4/coq7</i>		

Anexo 1. Estirpes de levaduras.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Función
FyCOQ4_ BamHI	CTACAAGGATCCACAAGTAAAAGAGT	Clonar yCOQ4 en pYES2.1
yCOQ4NS_R	TGCTGGAGTCGTGGCTCGT	Clonar yCOQ4 en pYES2.1
COQ4NOATG_F	AAGGGATCCTTGAGGTTATCTT	Clonar yCOQ4 en pET28a
V5XhoI_R	ACCCTCGAGCGTAGAATCGA	Clonar yCOQ4 en pET28a
A457G_A460G_F	ATTTTGAAGGAACAACCCAATATCGCAG CAGAGATTTTGCATATGGACAAAC	Mutagénesis T153A T154A
A457G_A460G_R	GTTTGTCCATATGCAAAATCTCTGCTGC GATATTGGGTTGTTCTTCAAAT	Mutagénesis T153A T154A
T550G_F	CAATGGTTGAAAAGAGAAAACGTTGCT CCGGACACTAG	Mutagénesis S184A
T550G_R	CTAGTGTCCGGAGCAACGTTTTCTCTTTT CAACCATTG	Mutagénesis S184A
A505G_F	CTAGCTAAATTGCCACATAACGCGTTTG GGTATGTATATTACC	Mutagénesis T169A
A505G_R	GGTAATATACATACCCAAACGCGTTATG TGGCAATTTAGCTAG	Mutagénesis T169A
G676A_F	CCTATTATCATTGAGGGGAAGATCACCA TAAAGGCTC	Mutagénesis <i>coq4-1</i>
G676A_R	GAGCCTTTATGGTGATCTTCCCCTCAAT GATAATAGG	Mutagénesis <i>coq4-1</i>
DM-Q4.1S	AAATAGTTGCGGTTTGTGGAAAAGAAG GGGAGGAAAGCAATTACAGCTGAAGCT TCGTACGC	Doble mutante <i>coq4/coq7</i>
DM-Q4.1A	ATTATAGCTGACTAAATAATAATATCTA ACTTCATGGGCGAGAGCATAGGCCACT AGTGGATCTG	Doble mutante <i>coq4/coq7</i>

Anexo 2. Cebadores.

Plásmido	Fuente
pET28 a	Novagen
pRS316	(Sikorski and Hieter, 1989)
pRS425	(Christianson et al., 1992)
pRS426	(Christianson et al., 1992)
pUG27	(Gueldener et al., 2002)
pYES2.1 TOPO TA	Invitrogen
pmCOQ2	
pmCOQ3	
pmCOQ4	(Padilla et al., 2009)
pmCOQ5	
pmCOQ6	
pmCOQ7	(Padilla et al., 2004)
pmCOQ8	(Padilla et al., 2009)
pmCOQ9	
psCOQ3	(Clarke et al., 1991)
psCOQ4 (pTL4)	(Belogradov et al., 2001)
psCOQ5	Cathy Clarke
psCOQ6	Cathy Clarke
psCOQ7	Cathy Clarke
psCOQ8	(Do et al., 2001)
psCOQ9	Cathy Clarke

Anexo 3. Plásmidos.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Análisis del complejo de síntesis de CoQ mediante estudios de sobreexpresión de los genes COQ

Como se ha comentado en la introducción, cada vez más resultados demuestran que, en eucariotas, las proteínas Coq se organizan formando un complejo multienzimático necesario para la síntesis de CoQ. Por ejemplo, los mutantes nulos para algunos de los genes *coq3-coq9* acumulan el mismo intermediario de la síntesis, HHB (Poon et al., 1997). Otro indicio de la existencia de este complejo es que la presencia de algunas proteínas Coq es necesaria para la función y mantenimiento de los niveles de otras proteínas Coq (Baba et al., 2004; Belogrudov et al., 2001; Gin and Clarke, 2005; He et al., 2014; Hsieh et al., 2007; Hsu et al., 2000; Johnson et al., 2005; Tran et al., 2006; Xie et al., 2012). Sin embargo, hay proteínas como Coq1p, Coq2p, Coq5p y Coq8p cuya expresión no se ve afectada en los mutantes nulos por lo que podrían no formar parte del complejo o actuar antes de su formación. Experimentos de cromatografía de exclusión molecular y BN-PAGE han demostrado la existencia de un complejo de 1,3 kDa en el que aparecen Coq3p, Coq4p, Coq5p, Coq6p y Coq7p (Marbois et al., 2005, 2009; Tauche et al., 2008).

La sobreexpresión de determinados genes puede utilizarse para el estudio de complejos de proteínas buscando la supresión de los efectos de determinadas mutaciones. La sobreexpresión de Coq8p en mutantes de la síntesis de CoQ ha sido utilizada con frecuencia para demostrar la formación del complejo de síntesis y para determinar la función catalítica de determinadas proteínas Coq mediante la identificación de intermediarios de la síntesis acumulados en los distintos casos (He et al., 2014; Ozeir et al., 2011; Padilla et al., 2009; Xie et al., 2012). Podemos considerar que la acumulación de HHB en algunos mutantes nulos para la síntesis de CoQ es un indicador de que no se forma complejo de síntesis. Sin embargo, la sobreexpresión de Coq8p en algunos de estos mutantes estabiliza de alguna manera el complejo y permite su formación aun en ausencia de una de estas proteínas. Este es el caso del mutante nulo *coq7*, donde la sobreexpresión de Coq8p permite la acumulación de

DMQ₆, sustrato de Coq7p, en ese mutante (Padilla et al., 2009). La sobreexpresión de Coq8p también sirvió para determinar la actividad C5-hidroxilasa de Coq6p (Ozeir et al., 2011) y la actividad C-metiltransferasa de Coq5p (Xie et al., 2012). Además, la sobreexpresión de Coq8p consigue recuperar los niveles de proteínas como Coq3p, Coq4p, Coq7p y Coq9p en algunos de los mutantes *coq* (Xie et al., 2012; Zampol et al., 2010). Por todo ello, la sobreexpresión de Coq8p ha ayudado a entender como se organiza el complejo de síntesis y cuál es la función de algunas de las proteínas que lo forman. Teniendo esto en cuenta, podemos utilizar la sobreexpresión de esta y otras proteínas Coq para obtener información sobre como se organiza el complejo de síntesis de CoQ₆.

1.1. Sobreexpresión de genes COQ en levaduras silvestres

Aunque normalmente los estudios de sobreexpresión se realizan en mutantes buscando suprimir la mutación, la sobreexpresión de genes en levaduras silvestres también puede darnos información sobre la función de estos genes. En el caso de la síntesis de CoQ₆, la sobreexpresión de uno de los genes implicados en la síntesis puede tener efectos sobre el contenido de CoQ₆ de la levadura y estos efectos podrían ser diferentes según su función. En la síntesis de COQ₆ existen proteínas que poseen una función catalítica: Coq2p es una polipreniltransferasa que se encarga de unir el anillo benzoquinónico a la cola poliisoprenoide (Ashby et al., 1992), Coq3p es una O-metiltransferasa (Hsu et al., 1996; Poon et al., 1999), Coq5p una C-metiltransferasa (Barkovich et al., 1997) y Coq6p y Coq7p dos hidroxilasas (Marbois and Clarke, 1996; Ozeir et al., 2011). Otras proteínas parecen tener una función estructural o reguladora como Coq4p, Coq8p o Coq9p. Sin embargo, algunas proteínas presentan una doble función enzimática y estructural. Este es el caso de COQ7, en el que los mutantes *Coq7-1* (Marbois and Clarke, 1996) *qm30*, *e2519* (Padilla et al., 2004) o E194K (Tran et al., 2006) acumulan DMQ₆ en lugar de HHB, lo que sugiere que Coq7p presenta esta doble función y en el caso de estos mutantes sólo se ve afectada la función enzimática pero no la estructural. Algo parecido ocurre en el caso de Coq5p en el que mutantes puntuales de levadura son rescatados por la expresión de su homólogo en *E.coli*, Ubi E,

mientras que esta misma proteína no es capaz de rescatar un mutante nulo de *Coq5* (Lee et al., 1997).

Para llevar a cabo la sobreexpresión y ver su efecto en una levadura silvestre, los genes *COQ* (*COQ2-COQ9*) fueron clonados en el plásmido multicopia de expresión en levaduras pRS426. Levaduras silvestres de la estirpe BY4741 fueron transformadas con estos plásmidos y cultivadas en medio selectivo con glucosa. A partir de estos cultivos se purificó una fracción enriquecida en mitocondrias y se realizó una extracción de lípidos para su posterior análisis mediante HPLC-ECD para determinar el contenido en CoQ₆.

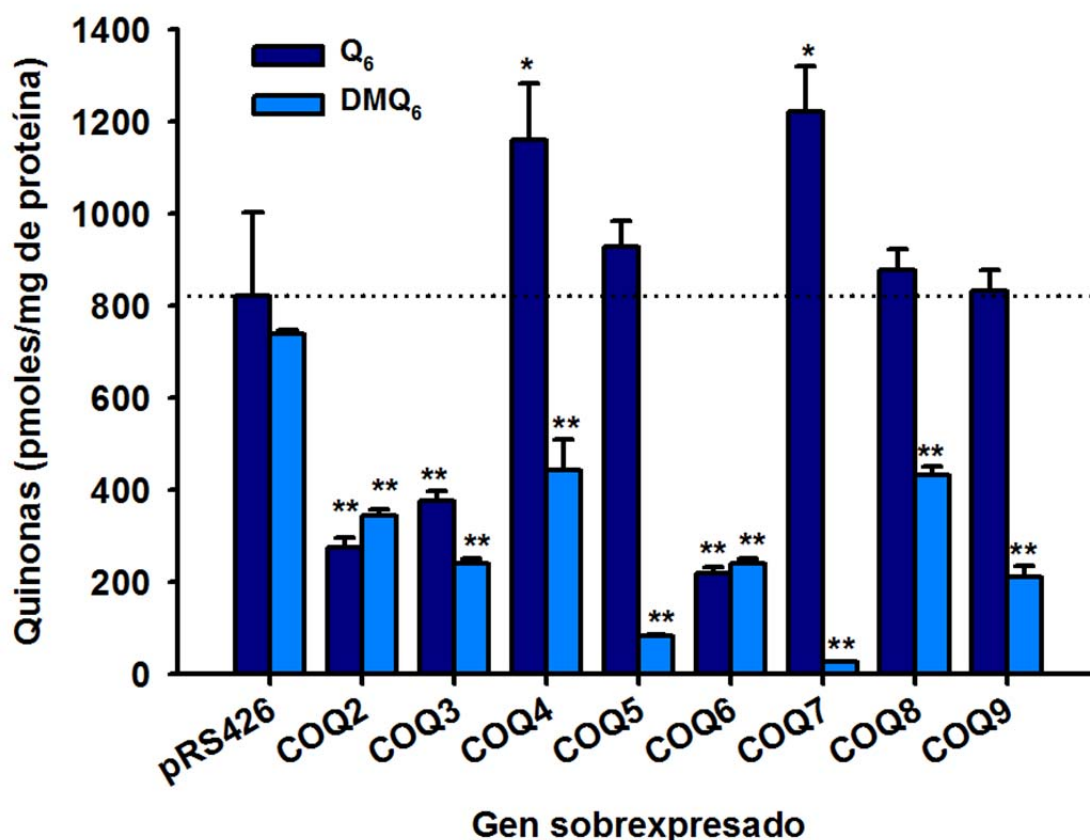


Figura 8. Sobreexpresión de genes *COQ* en levaduras silvestres. Las levaduras fueron transformadas con los distintos genes *COQ* en el plásmido multicopia pRS426. Se realizó una extracción lipídica a partir de 500 µg de mitocondria procedentes de estas levaduras y se analizó su contenido en quinonas mediante HPLC. El ensayo se llevó a cabo por triplicado a partir de tres cultivos independientes. Los valores corresponden a la media ± SD de al menos tres medidas independientes expresada en pmoles de CoQ₆ / mg de proteína. *P<0,05 y **P<0,001, diferencias significativas con respecto al control (pRS416).

A la vista de los resultados (Figura 8), la sobreexpresión de algunos genes *COQ* (*COQ2*, *COQ3* y *COQ6*) provocan una disminución de los niveles de CoQ₆. Como hemos dicho antes, las proteínas codificadas por estos genes poseen una función enzimática en la síntesis de CoQ₆ por lo que un exceso de éstas puede afectar de manera negativa al funcionamiento del complejo.

Por otro lado, la sobreexpresión de otros genes producen un aumento de los niveles de CoQ₆ con respecto a la levadura control. Estos genes son *COQ4* y *COQ7*. *COQ4* codifica para una proteína de función desconocida pero cada vez parece más evidente que posee una importante función estructural, e incluso ha sido propuesta como nucleadora del complejo de síntesis. Si partimos de la idea de que Coq4p actúa como nucleadora de este complejo, el hecho de que hubiera más proteína presente podría hacer que se formara un mayor número de complejos de síntesis alrededor de cada molécula de proteína por lo que aumentaría el número de moléculas de CoQ₆ que se sintetizarían. El hecho de que Coq7p posea, además de una función catalítica, una función estructural puede explicar que su sobreexpresión haga que la síntesis de CoQ₆ aumente ya que ayuda a estabilizar el complejo de síntesis.

Existen otros genes cuya sobreexpresión parece no tener efecto en la cantidad de CoQ₆ sintetizado como es el caso de *COQ5*, *COQ8* y *COQ9*, donde los niveles de CoQ₆ son muy similares al de la levadura silvestre. Estas proteínas poseen una función estructural o reguladora por lo que quizás, en una levadura silvestre en la que existe un complejo de síntesis de CoQ₆ ya formado y funcional, una mayor cantidad de estas proteínas no tiene un efecto notable en los niveles de CoQ₆.

Estos resultados encajan con la idea de que la sobreexpresión de proteínas que poseen actividad enzimática pueden tener un efecto negativo en la síntesis de CoQ mientras que proteínas con mayor participación en la formación o estabilización del complejo pueden tener un efecto positivo o no tener efecto en la síntesis.

1.2. Sobreexpresión de proteínas Coq en mutantes nulos de levadura

Después de observar el efecto de la sobreexpresión en levaduras silvestre de los distintos genes *COQ*, parece interesante comprobar el efecto que tiene en los distintos

mutantes nulos en la síntesis de CoQ₆. Algunos experimentos de sobreexpresión ya se han realizado en algunos mutantes. Los primeros genes candidatos para analizar que efecto producía su sobreexpresión en un mutante nulo *coq7* fueron *COQ4* y *COQ8* debido a su posible función reguladora. La sobreexpresión de *COQ4* no tuvo ningún resultado y el mutante sólo acumuló HHB. Sin embargo, La sobreexpresión de *COQ8* en un mutantes nulo *coq7* produce la acumulación de DMQ₆, sustrato de Coq7p, lo que indica que esta sobreexpresión permite la existencia de un complejo de síntesis en ausencia de Coq7p (Padilla et al., 2009). A partir de estos resultados, la sobreexpresión de *COQ8* se ha realizado en todos los mutantes *coq* indicando que, en algunos casos, su sobreexpresión permite la formación del complejo en ausencia de alguna de las proteínas y lleva a la acumulación de intermediarios tardíos diferentes al HHB (Xie et al., 2012).

Teniendo en cuenta la información que la sobreexpresión de *COQ8* nos ha dado, llevaremos a cabo la sobreexpresión de los distintos genes *COQ* en los diferentes mutantes nulos *coq*. Para ello, transformamos las distintas levaduras mutantes con los genes *COQ* en el plásmido multicopia pRS426 y el plásmido de copia simple pRS316. Las levaduras fueron cultivadas en medio selectivo con glucosa. A partir de estas muestras se purificó una fracción enriquecida en mitocondrias y se realizó una extracción de lípidos para su posterior cuantificación mediante HPLC-ECD.

1.2.1. Sobreexpresión de genes *COQ* en un mutante nulo *coq3*

El mutante *coq3* fue transformado con el gen *COQ3* silvestre en plásmido en copia simple (sCOQ3) y en multicopia (mCOQ3). El gen en copia simple rescató los niveles de CoQ₆ hasta valores similares al de la levadura silvestre mientras que en multicopia los valores de CoQ₆ eran mucho menores (Figura 9). Este es el mismo efecto que observamos en el caso de la sobreexpresión de *COQ3* en la levadura silvestre, un exceso de proteína Coq3 afecta de manera negativa a la síntesis de CoQ₆, probablemente debido a que posee una función enzimática. Además de *COQ3* también se sobreexpresaron otros genes como *COQ4*, *COQ5* y *COQ8* con una posible función reguladora o estructural para ver si producen algún efecto en el mutante *coq3*. La

sobreexpresión de ninguno de estos genes produjo acumulación de CoQ₆ o DMQ₆ ni de ningún otro intermediario (Figura 9).

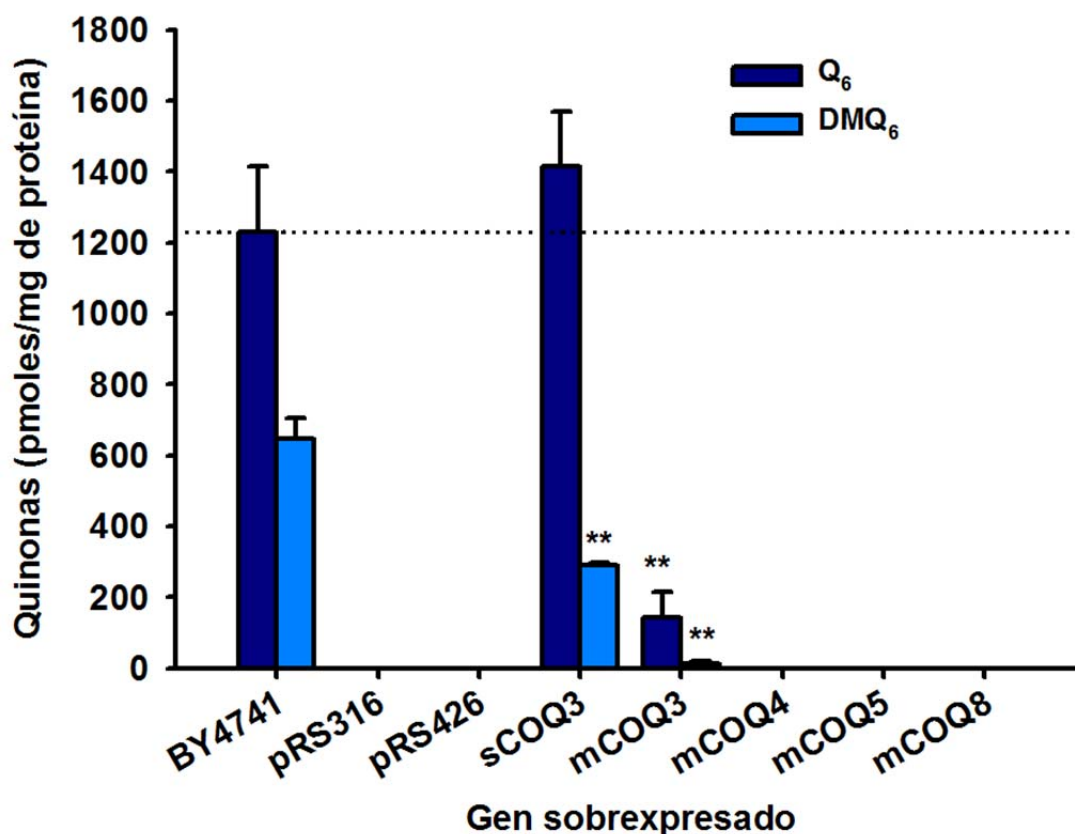


Figura 9. Sobreexpresión de genes *COQ* en un mutante nulo *coq3*. Levaduras mutantes *coq3* fueron transformadas con distintos genes *COQ* en el plásmido multicopia pRS426 (mCOQ) o en el plásmido de copia simple pRS316 (sCOQ). Se realizó una extracción lipídica a partir de 500 µg de mitocondria procedentes de estas levaduras y se analizó mediante HPLC. El ensayo se llevó a cabo por triplicado a partir de tres cultivos independientes. Los valores corresponden a la media ± SD de al menos tres medidas independientes expresada en pmoles de CoQ₆ / mg de proteína. **P<0,001.

1.2.2. Sobreexpresión de genes *COQ* en un mutante nulo *coq4*

El mutante *coq4* fue transformado con el gen *COQ4* silvestre en plásmido en copia simple (sCOQ4) y con todos los genes *COQ* en multicopia (mCOQ). La sobreexpresión de ninguno de los genes *COQ* hizo que se acumulara CoQ₆ o DMQ₆ ni ningún otro intermediario distinto al HHB excepto en el caso del mismo gen *COQ4*. Cuando el gen

fue expresado en un plásmido de copia simple los niveles de CoQ₆ y DMQ₆ fueron muy similares a los de la levadura silvestre. Cuando se expresó en un plásmido multicopia la cantidad de CoQ₆ sintetizada fue mucho mayor. Este resultado coincide con el obtenido en el caso de la levadura silvestre en el que la sobreexpresión de *COQ4* provocó un aumento de la cantidad de CoQ₆ por lo que parece que la presencia de Coq4p favorece la síntesis de CoQ₆, probablemente debido a su función nucleadora, es decir, un mayor número de moléculas de Coq4p disponibles permitiría la formación de mayor número de complejos de síntesis. El hecho de la sobreexpresión de ningún otro gen provocara la acumulación de CoQ₆ o DMQ₆ apoyan la idea de que Coq4p actúa como nucleador del complejo y, por lo tanto, es esencial para su formación.

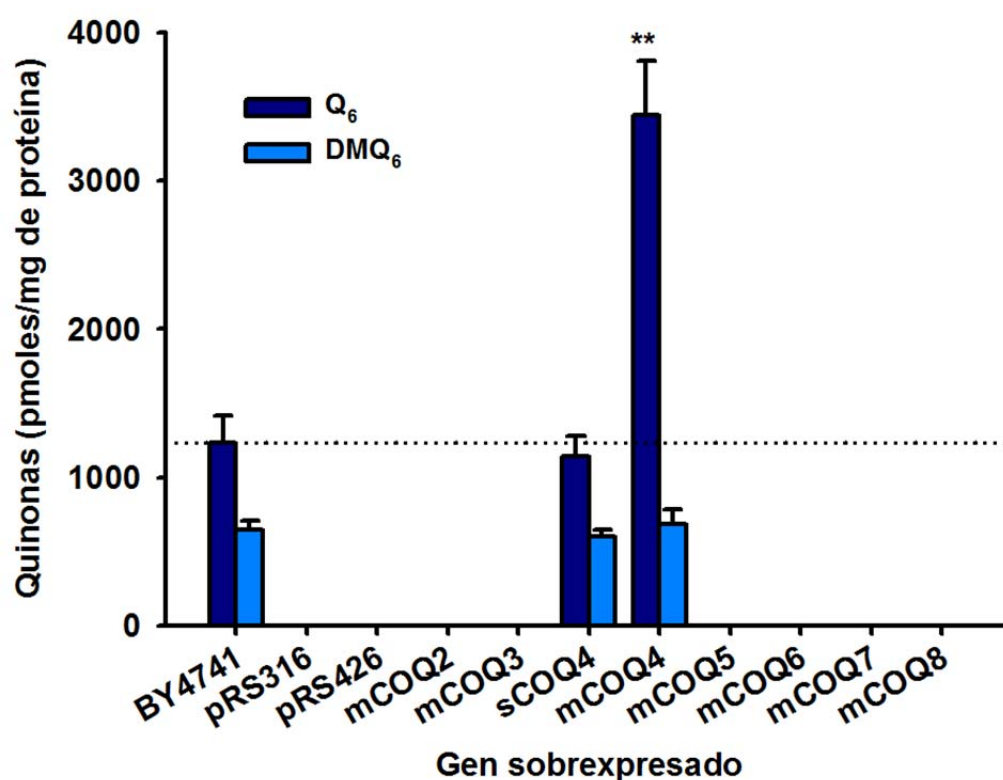
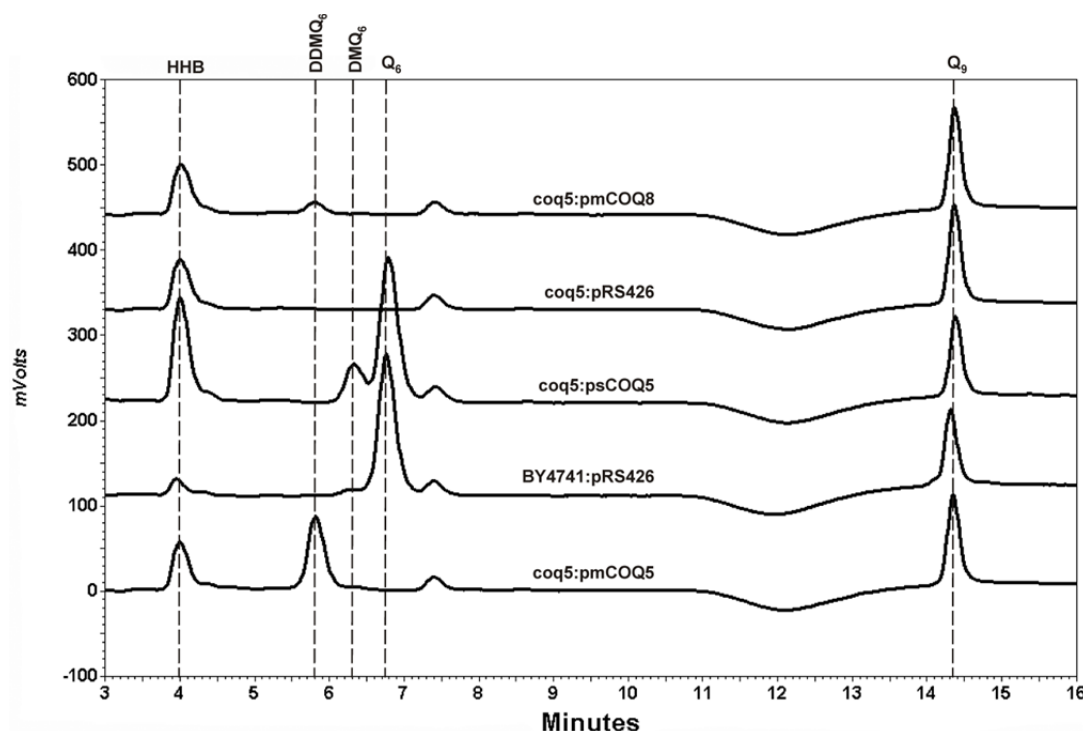


Figura 10. Sobreexpresión de genes *COQ* en un mutante nulo *coq4*. Levaduras mutantes *coq4* fueron transformadas con los distintos genes *COQ* en el plásmido multicopia pRS426 (mCOQ) o en el plásmido de copia simple pRS316 (sCOQ). Se realizó una extracción lipídica a partir de 500 µg de mitocondria procedentes de estas levaduras y se analizó mediante HPLC. El ensayo se llevó a cabo por triplicado a partir de tres cultivos independientes. Los valores corresponden a la media ± SD de al menos tres medidas independientes expresada en pmoles de CoQ₆ / mg de proteína. **P<0,001.

1.2.3. Sobreexpresión de genes *COQ* en un mutante nulo *coq5*

El mutante *coq5* fue transformado con el gen *COQ5* silvestre en plásmido de copia simple (sCOQ5) y en multicopia (mCOQ5). El gen en copia simple consiguió rescatar la síntesis de CoQ₆ hasta valores similares a los de la levadura silvestre. Curiosamente, la expresión de *COQ5* en multicopia no consiguió rescatar al mutante nulo y sólo se acumuló un intermediario, que aunque no ha sido identificado, suponemos que es DDMQ₆, el sustrato de Coq5p. Lo mismo ocurre en el caso de la sobreexpresión de *COQ8* (Figura 11). La acumulación de DDMQ₆ sugiere que el exceso de proteína Coq5 o Coq8 ayuda a estabilizar el complejo. Sin embargo, en el caso de Coq5, este exceso tiene un efecto negativo sobre la actividad metiltransferasa de Coq5p por lo que la proteína puede realizar su función estructural pero no catalítica. Este resultado podría explicarse de la siguiente manera. Coq5p es una de las proteínas de la síntesis de CoQ₆ cuya expresión no se ve afectada por la ausencia de otras proteínas Coq. La razón de esto podría ser que, aunque es necesaria para estabilizar el complejo, no permanezca unida permanente, por lo que un exceso de esta proteína no interfiere de forma tan negativa como el exceso de otras en la estabilización del complejo. Por otra parte, todo indica que la síntesis de CoQ₆ es un proceso secuencial en el que las proteínas Coq actúan una por una modificando el anillo quinónico. Un exceso de proteína Coq5 puede hacer que está no se una al sitio adecuado para llevar a cabo su función enzimática y por tanto la síntesis se detiene en este punto, acumulándose DDMQ₆. Sin embargo, en la levadura silvestre la sobreexpresión de *COQ5* no producía este efecto negativo y los niveles de CoQ₆ eran normales. En este caso el complejo ya estaría formado previamente a la sobreexpresión por lo que Coq5p se encontraría en su lugar correcto y podría llevar a cabo su doble función en la síntesis a diferencia de lo que ocurre en el mutante nulo donde no existe un complejo previo. La sobreexpresión de *COQ4* no produjo ningún efecto en el mutante *coq5*.

A



B

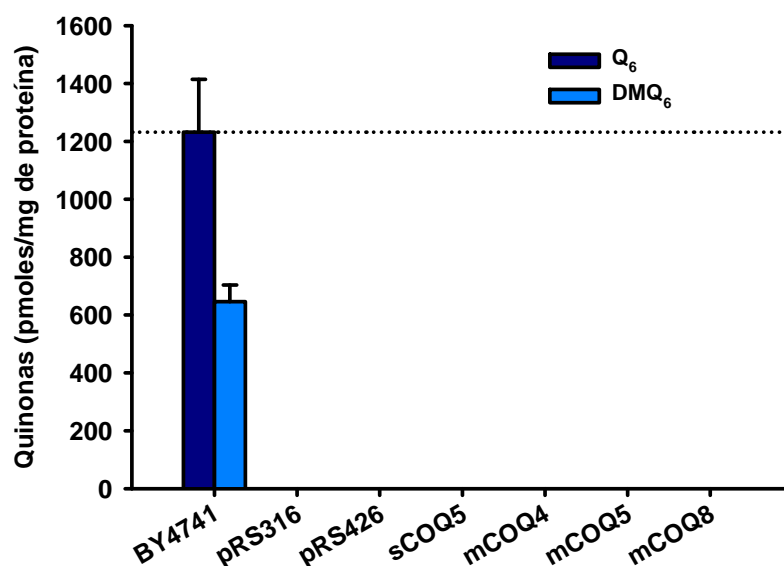


Figura 11. Sobreexpresión de genes *COQ* en un mutante nulo *coq5*. Levaduras mutantes *coq5* fueron transformadas con los distintos genes *COQ* en el plásmido multicopia pRS426 (mCOQ) o en el plásmido de copia simple pRS316 (sCOQ). Se realizó una extracción lipídica a partir de 500 μ g de mitocondria procedentes de estas levaduras y se analizó mediante HPLC. **A.** En el cromatograma se observan los distintos compuestos acumulados en cada caso. **B.** Niveles de CoQ₆ o DMQ₆. El ensayo se llevó a cabo por triplicado a partir de tres cultivos independientes. Los valores corresponden a la media \pm SD de al menos tres medidas independientes expresada en pmoles de CoQ₆ / mg de proteína.

1.2.4. Sobreexpresión de genes *COQ* en un mutante nulo *coq6*

El mutante *coq6* fue transformado con el gen *COQ6* silvestre en plásmido de copia simple (sCOQ6) y en multicopia (mCOQ6). El gen en copia simple rescató los niveles de CoQ₆ hasta valores incluso mayores que los de la levadura silvestre mientras que en multicopia los valores de CoQ₆ eran mucho menores. Este coincide con el efecto que observamos en el caso de la sobreexpresión de *COQ6* en la levadura silvestre, el exceso de esta proteína provoca una disminución de la síntesis de CoQ₆, probablemente debido a que posee una función enzimática. También se sobreexpresaron otros genes como *COQ4*, *COQ5* y *COQ8* que no parecen tener ningún efecto en este mutante ya que no se produce acumulación de CoQ₆ o DMQ₆ (Figura 12).

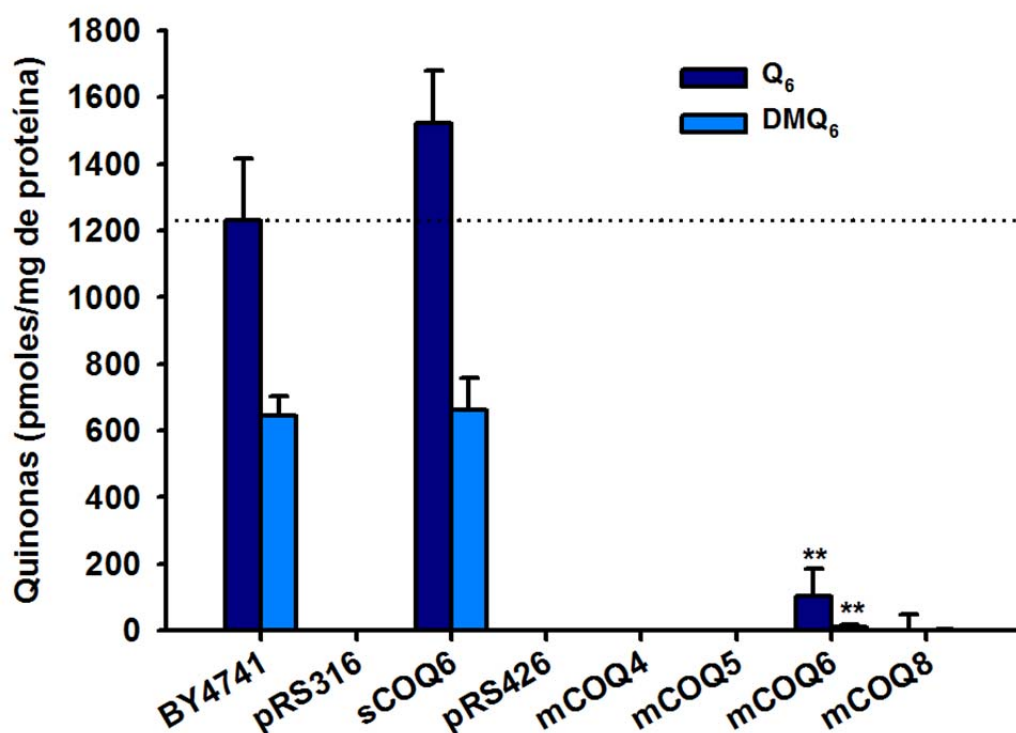


Figura 12. Sobreexpresión de genes *COQ* en un mutante nulo *coq6*. Levaduras mutantes *coq6* fueron transformadas con distintos genes *COQ* en el plásmido multicopia pRS426 (mCOQ) o en el plásmido de copia simple pRS316 (sCOQ). Se realizó una extracción lipídica a partir de 500 µg de mitocondria procedentes de estas levaduras y se analizó mediante HPLC. El ensayo se llevó a cabo por triplicado a partir de tres cultivos independientes. Los valores corresponden a la media \pm SD de al menos tres medidas independientes expresada en pmoles de CoQ₆ / mg de proteína. **P<0,001.

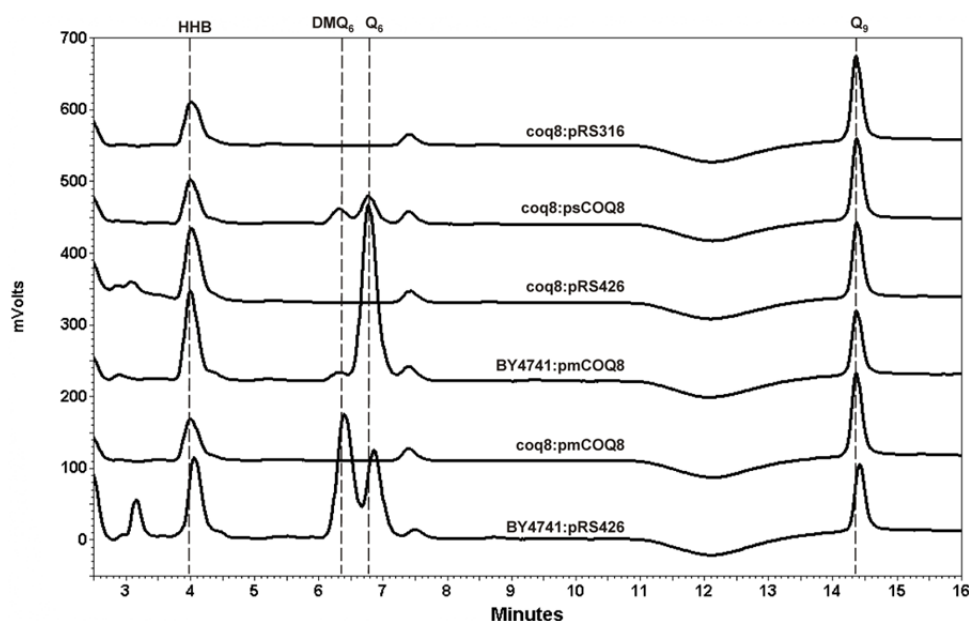
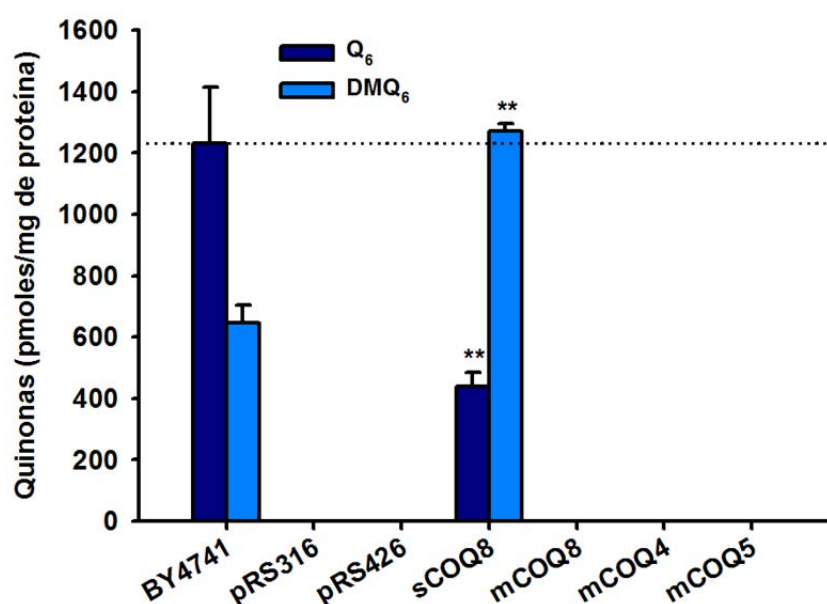
A**B**

Figura 13. Sobreexpresión de genes *COQ* en un mutante nulo *coq8*. Levaduras mutantes *coq8* fueron transformadas con algunos de los genes *COQ* en el plásmido multicopia PRS426 (mCOQ) o, en el caso de *COQ8*, en el plásmido de copia simple PRS316 (sCOQ). Se realizó una extracción lipídica a partir de 500 µg de mitocondria procedentes de estas levaduras y se analizó mediante HPLC. **A.** En el cromatograma se observan los distintos compuestos acumulados en cada caso. **B.** Niveles de CoQ₆ o DMQ₆. El ensayo se llevó a cabo por triplicado a partir de tres cultivos independientes. Los valores corresponden a la media ± SD de al menos tres medidas independientes expresada en pmoles de CoQ₆ / mg de proteína. **P<0,001.

1.2.5. Sobreexpresión de genes COQ en un mutante nulo *coq8*

El mutante *coq8* fue transformado con el gen *COQ8* silvestre en plásmido de copia simple (sCOQ8) y en multicopia (mCOQ8). Al igual que ocurre al sobreexpresar *COQ5* y *COQ4*, la expresión en multicopia de *COQ8* no consiguió rescatar al mutante nulo, mientras que este si lo hacía en copia simple. Podemos pensar que un exceso de Coq8p afecte de manera negativa a la formación del complejo, pero esto no es así en el caso de la sobreexpresión en el silvestre. Es posible que en el caso del silvestre en el que ya existe previamente un complejo, la expresión de una mayor cantidad de proteína no afecte a la síntesis. Sin embargo, en el mutante *coq8*, donde previamente no existe complejo, una gran cantidad de proteína Coq8 puede hacer que se formen un complejo de síntesis de manera incorrecta y, por lo tanto, no sea funcional.

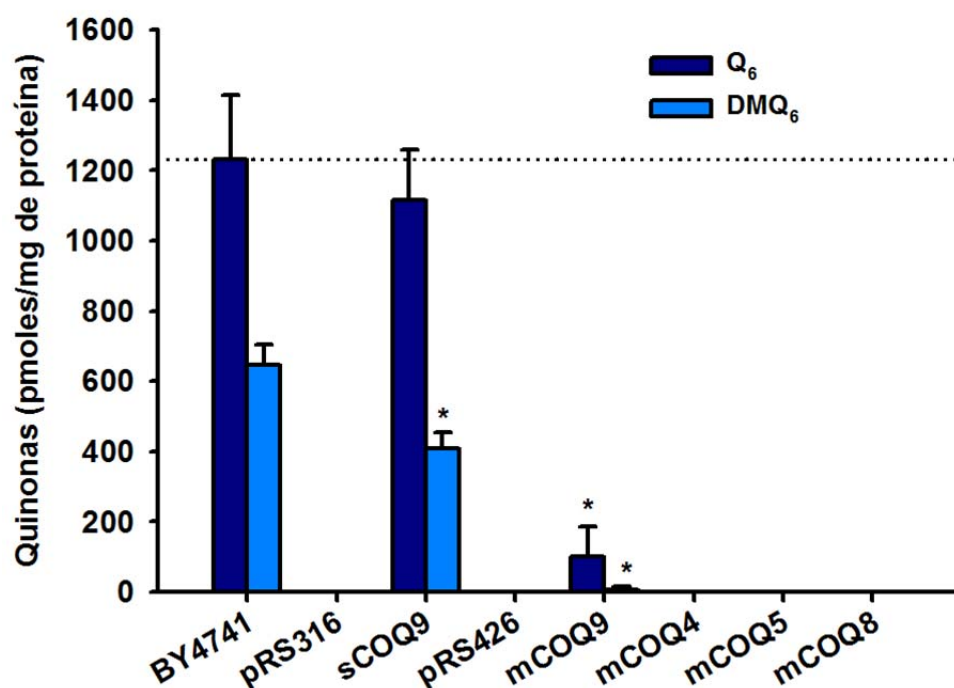


Figura 14. Sobreexpresión de genes COQ en un mutante nulo *coq9*. Levaduras mutantes *coq9* fueron transformadas con distintos genes COQ en el plásmido multicopia pRS426 (mCOQ) o en el plásmido de copia simple pRS316 (sCOQ). Se realizó una extracción lipídica a partir de 500 µg de mitocondria procedentes de estas levaduras y se analizó mediante HPLC. El ensayo se llevó a cabo por triplicado a partir de tres cultivos independientes. Los valores corresponden a la media \pm SD de al menos tres medidas independientes expresada en pmoles de CoQ₆ / mg de proteína. *P<0,05.

1.2.6. Sobreexpresión de genes COQ en un mutante nulo *coq9*

El mutante *coq9* fue transformado con el gen *COQ9* silvestre en plásmido de copia simple (sCOQ9) y en multicopia (mCOQ9). El gen en copia simple rescató los niveles de CoQ₆ hasta similares a los de la levadura silvestre mientras que en multicopia los valores de CoQ₆ eran mucho menores (Figura 14). Al igual que hemos dicho antes para otras proteínas, un exceso de ésta puede provocar un ensamblaje incorrecto del complejo no pudiendo sintetizarse CoQ₆.

1.2.7. Sobreexpresión de genes COQ en un mutante nulo *coq7*

El mutante *coq7* fue el primer mutante de la síntesis de CoQ₆ en el que se consiguió rescatar la formación del complejo de síntesis mediante la sobreexpresión de *COQ8* (Padilla et al., 2009). Por ello, es interesante ver el efecto que tiene la sobreexpresión del resto de genes *COQ* en este mutante.

El mutante *coq7* fue transformado con el gen *COQ7* silvestre en plásmido de copia simple (sCOQ7) y en multicopia (mCOQ7). Al contrario de lo que ocurre en otros mutantes como *coq8* o *coq5* al sobreexpresar estos genes, la expresión en plásmido multicopia de *COQ7* en el mutante *coq7* produjo un aumento de los niveles de CoQ₆ con respecto al silvestre y una disminución de los niveles de DMQ₆ (Figura 15 A y 16 A), lo cual tiene sentido ya que el DMQ₆ es el sustrato de esta enzima. Coq7p parece ser un punto de control en la regulación de la síntesis de CoQ₆. Como se ha comentado en la introducción, la levadura, antes de entrar en fase post-diáuxica, acumula DMQ₆ para que, si es necesario un cambio a metabolismo respiratorio, este DMQ₆ pueda transformarse rápidamente en CoQ₆. Esto podría ocurrir a través de la activación de Coq7p, que toma el DMQ₆ como sustrato. Es posible que las proteínas Coq formen un precomplejo que es capaz de modificar el HHB hasta dar lugar a DMQ₆. Cuando se necesita COQ₆, Coq7p se activa por desfosforilación pudiendo unirse al precomplejo para dar lugar al complejo final de síntesis de CoQ₆. Es por ello que al sobreexpresar *COQ7* se produce rápidamente la conversión de DMQ₆ en CoQ₆.

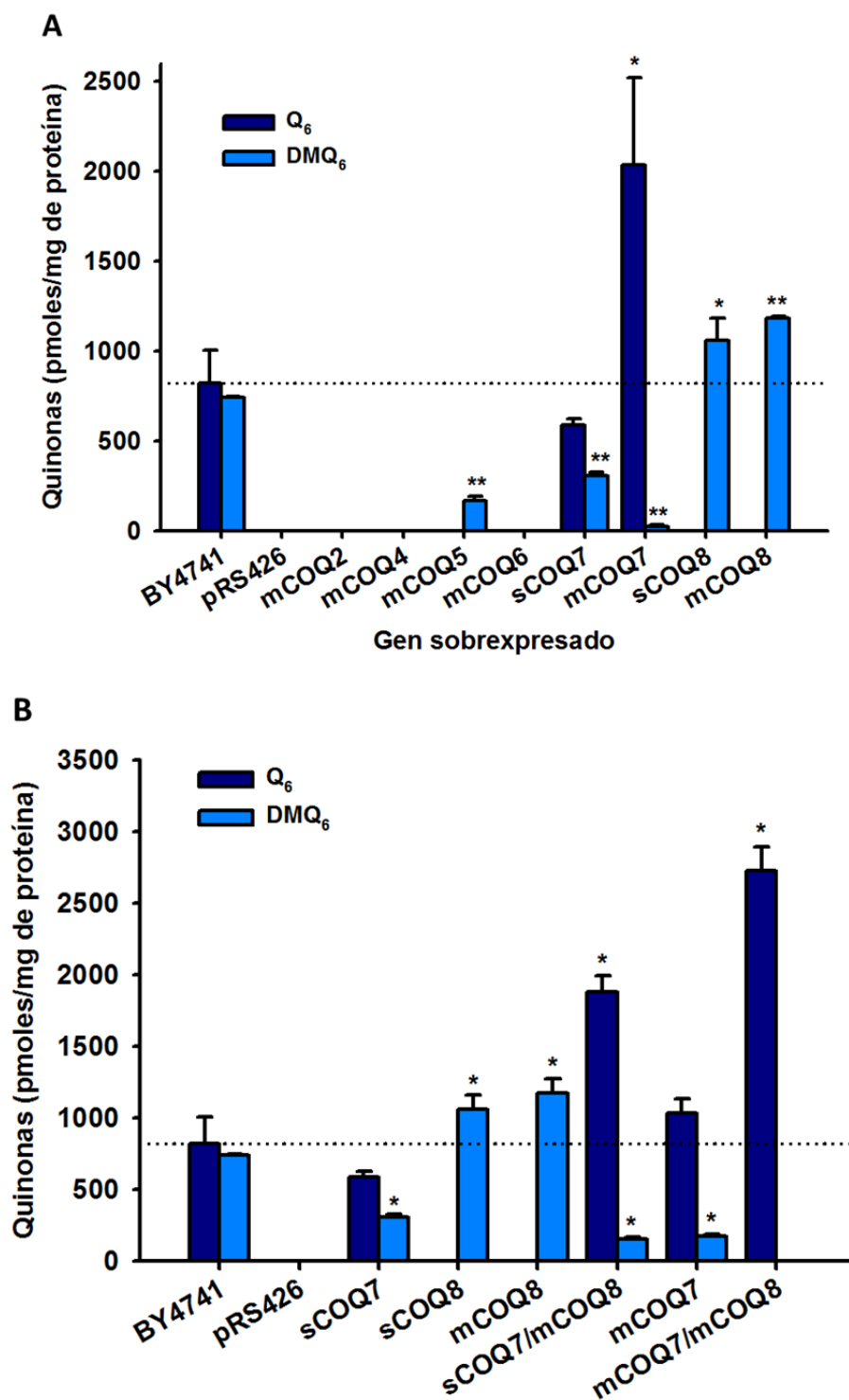
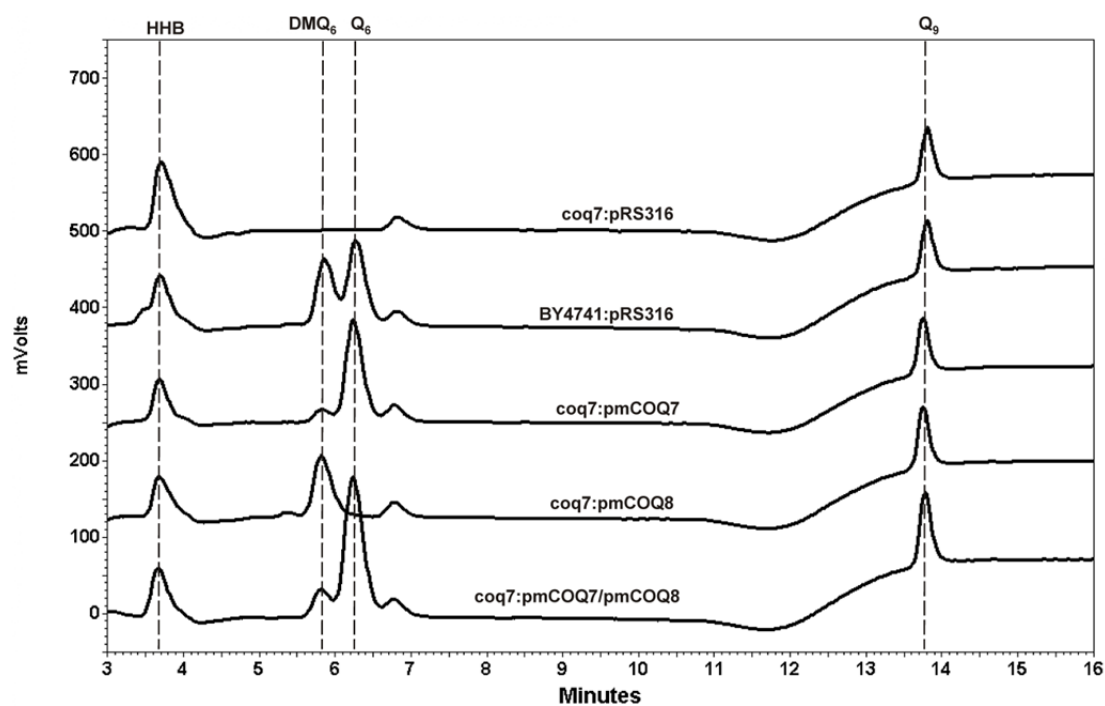


Figura 15. Niveles de CoQ₆ y DMQ₆ de las levaduras mutantes en *coq7* sobreexpresando los distintos genes *COQ*. **A.** La sobreexpresión de COQ7 tanto en un plásmido de copia simple como multicopia rescató la síntesis de CoQ₆ en el mutante nulo, siendo mayor en el caso del plásmido multicopia. La sobreexpresión de COQ5 y COQ8, a diferencia de otros genes COQ, produjo la acumulación de DMQ₆ aun en ausencia de COQ7. **B.** La expresión conjunta de COQ7 y COQ8 aumentó la síntesis de COQ₆ por encima de los valores obtenidos en el caso de expresar sólo COQ7. *P<0,05 y **P<0,001.

A



B

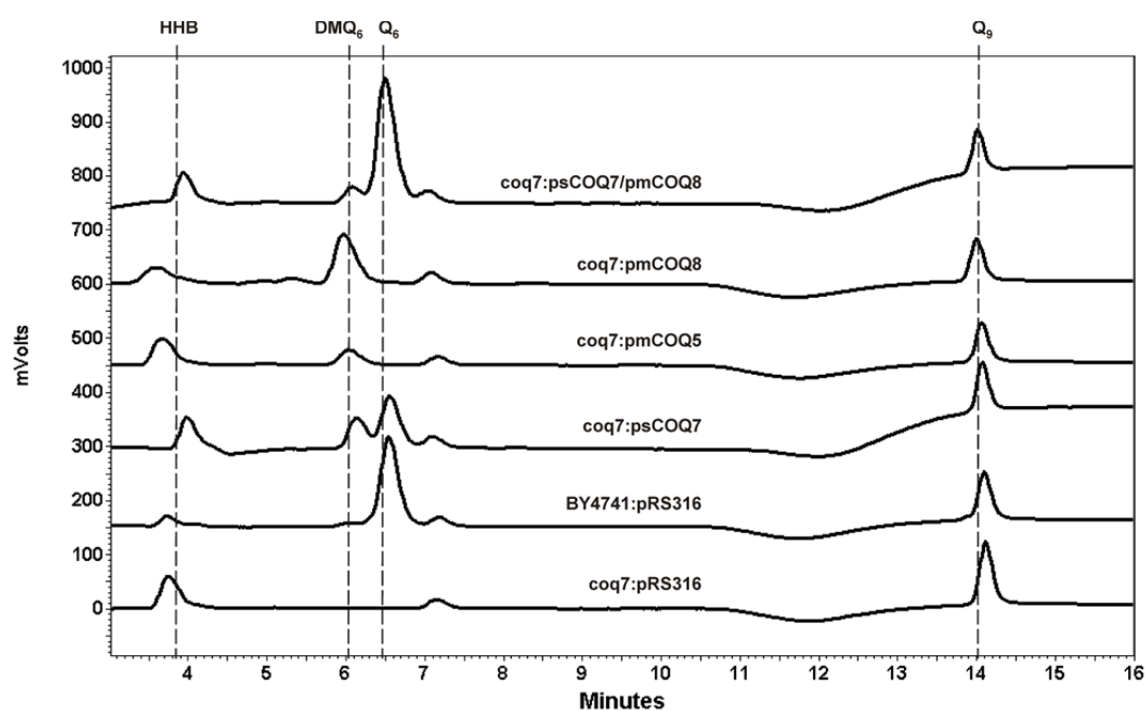


Figura 16. Compuestos quinónicos acumulados en el mutante *coq7* sobreexpresando distintos genes *COQ*. Se realizó una extracción de lípidos a partir de muestras de mitocondria y se analizó su contenido mediante HPLC. Se utilizó CoQ₉ como estándar interno.

Aparte de *COQ7*, también se sobreexpresaron otros genes en plásmido multicopia (mCOQ) (Figura 15 A). En el caso de *COQ8*, tanto en plásmido de copia simple (sCOQ8) como en multicopia. La expresión de *COQ8* en ambos caso llevó a la acumulación de DMQ₆. Lo más curioso es que la sobreexpresión de *COQ5* hizo que se acumulara DMQ₆ (Figuras 15 A y 16 B), es decir, un exceso de proteína Coq5 ayuda a estabilizar el complejo de síntesis en ausencia de Coq7p al igual que lo hace Coq8p lo cual apoya la idea de que Coq5p posee una función estructural en el complejo.

Además de sobreexpresar *COQ8* en un mutante *coq7*, también se cotransformó este mutante con *COQ8* en plásmido multicopia y *COQ7* (tanto en multicopia como en copia simple) (Figura 15 B). Al igual que en la Figura 8 A, la expresión de *COQ7* rescataba la síntesis de CoQ₆ en el mutante, aunque en el caso de un plásmido multicopia los niveles de CoQ₆ eran incluso mayores que los del silvestre. Cuando se sobreexpresa a la vez *COQ8* estos niveles aumentan en ambos casos, siendo mayores que los del silvestre en el caso de sCOQ7 y casi el triple en el caso de mCOQ7.

A la vista de todos los resultados obtenidos de la sobreexpresión de distintos genes COQ en los mutantes nulos podríamos clasificar estos genes según el efecto que producen en los niveles de CoQ₆.

Hay genes como *COQ4* y *COQ7* cuya sobreexpresión produce un efecto positivo y la cantidad de CoQ₆ aumenta. Esto ocurre tanto en el caso de una levadura silvestre como delecionada para este gen, es decir, una gran cantidad de proteína favorece la síntesis de CoQ₆. En ambos caso, esto podría deberse a que tanto Coq4p como Coq7p son factores limitantes en el proceso de síntesis. En el caso de Coq4p, esta proteína tiene una posible función nucleadora, por lo que cuando las demás proteínas Coq están presentes el número de complejo de síntesis que se forman dependen del número de moléculas de Coq4p. Con Coq7p ocurriría algo parecido. Todo parece indicar que la actividad de Coq7p actúa como punto de control en la síntesis de CoQ₆ regulando la conversión de DMQ₆ a CoQ₆, es decir, la proteína sería un factor limitante para este paso. Una gran cantidad de proteína debida a la sobreexpresión dispararía la conversión de DMQ₆ a CoQ₆ y esto explicaría el aumento.

Existen también genes como *COQ5* y *COQ8* cuya sobreexpresión no afecta a una levadura silvestre pero en el caso de una levadura mutante para *coq5* y *coq8* respectivamente, el exceso de proteína provoca que no se sintetice CoQ₆. Una posible causa es que cuando se sobreexpresan en una levadura silvestre existe ya un complejo de síntesis previamente formado, mientras que en el mutante el complejo tiene que formarse y este exceso de proteína puede interferir en su correcto ensamblaje. En el caso de Coq5p la sobreexpresión en el mutante nulo si ayuda a la formación del complejo pero afecta a la actividad metiltransferasa porque se observa acumulación de DDMQ y no hay síntesis de CoQ₆. Probablemente, aunque la proteína esté presente en el complejo, el exceso impida que se sitúe en el lugar correcto para llevar a cabo su función enzimática. Cuando sobreexpresamos la proteína Coq9 ocurriría algo similar a lo que ocurre en el caso de Coq5p y Coq8p aunque la síntesis de CoQ₆ no se detiene por completo al sobreexpresarla en el mutante *coq9*, pero si provoca una disminución de los niveles.

Por último, hay genes cuya sobreexpresión producen un efecto negativo en la síntesis de CoQ₆ tanto en la levadura silvestre como en los mutantes nulos como es el caso de *COQ3* y *COQ6*. Estos genes codifican proteínas con función catalítica y de alguna manera, al aparecer en exceso, interfieren en el complejo.

Por otro lado, la expresión de todos los genes en copia simple rescata la síntesis de CoQ₆ hasta valores cercanos a los de una levadura silvestre ya que esta expresión es similar a la expresión que tendría un gen endógeno en una levadura silvestre.

Tras este análisis general, es necesario destacar el caso de Coq4p en el que su sobreexpresión lleva a un aumento en los niveles de CoQ₆ y esto encaja con una posible función nucleadora. El hecho de que posea esta función hace que parezca de gran importancia para entender el proceso de formación del complejo de síntesis por lo que, a continuación, nos centraremos en el estudio de la función de esta proteína y como participa en este proceso.

Gen	Niveles de CoQ ₆		
	mCOQ en WT	mCOQ en mutantes nulos	sCOQ en mutantes nulos
<i>COQ7</i> <i>COQ4</i>	↑	↑	= WT
<i>COQ5</i> <i>COQ8</i>	=	X	=WT
<i>COQ9</i>	=	↓	=WT
<i>COQ3</i> <i>COQ6</i>	↓	↓	=WT

Tabla 6. Efecto de la sobreexpresión de genes COQ en los niveles de COQ₆.

2. Caracterización de Coq4p como una fosfoproteína

Coq4p es una proteína de función desconocida pero indispensable para la síntesis de CoQ en eucariotas. Fue descrita por primera vez en *S. cerevisiae* (Belogrudov et al., 2001) aunque se han encontrado homólogos de esta proteína en todos los organismos eucariotas y algunos procariotas (Marbois et al., 2009). El análisis de su secuencia lleva a pensar que esta proteína no presenta una actividad catalítica y cada vez hay más indicios de que su función es intervenir en la formación y estabilización de un complejo multienzimático necesario para la síntesis de CoQ (Marbois et al., 2009). Aunque no se conoce su estructura tridimensional, existe un modelo de la proteína Coq4 de *S. cerevisiae* basado en la de la proteína Alr8543, su homóloga en *Nostoc sp.* PCC7120, que fue resuelta por cristalografía de rayos X. Este modelo apoya esta función estabilizadora y sugiere que Coq4p podría servir de anclaje a la cola isoprenoide de un intermediario lipídico de la síntesis y permitir que el resto de proteínas del complejo lleven a cabo las modificaciones necesarias para obtener una molécula de CoQ (Rea et al., 2010).

Cada vez es más evidente que la fosforilación juega un papel importante en la síntesis de CoQ. Uno de los motivos que nos lleva a pensar esto es la existencia de una presunta quinasa, Coq8p (Leonard et al., 1998). Además, se ha descrito que algunas proteínas implicadas en la síntesis de CoQ como Coq3p, Coq5p y Coq7p son fosforiladas de manera dependiente de Coq8p, aunque no sabemos si directa o indirectamente (Tauche et al., 2008). En general, la fosforilación de las proteínas Coq parece regular de manera positiva la síntesis de CoQ ya que la ausencia de Coq8p hace que no se forme el complejo de síntesis y que sólo se acumule el mismo intermediario temprano, HHB (Do et al., 2001). Sin embargo, aún queda por determinar si la fosforilación es necesaria para que se produzca el ensamblaje del complejo de síntesis o se produce sobre el complejo ya formado. Teniendo en cuenta que Coq4p parece ser necesaria desde el inicio de la formación del complejo, esto plantearía si es necesario que Coq8p actúe previamente a la acción de Coq4p o si, por el contrario, Coq4p actúa de manera independiente a Coq8p.

Experimentalmente se ha demostrado que Coq7p juega un papel importante en la regulación de la síntesis de CoQ₆ en *S. cerevisiae* mediante fosforilación (Martin-Montalvo et al., 2011, 2013). Para llevar a cabo este estudio, se analizó la secuencia de la proteína mediante el programa ScanProsit (de Castro et al., 2006) y se detectaron tres posibles sitios de fosforilación. Estos residuos se modificaron a alanina para conseguir una versión de la proteína permanentemente desfosforilada. Como consecuencia de estas modificaciones se observó un aumento en los niveles de CoQ₆ en la levadura. Para obtener una versión de la proteína permanentemente fosforilada estos mismos residuos fueron sustituidos por glutámico o aspártico. En este caso se observó una disminución en los niveles de CoQ₆. A diferencia de lo que ocurre con el resto de las proteínas Coq que se fosforilan, en el caso de Coq7p esta fosforilación hace que disminuya la síntesis de CoQ₆ y se acumule DMQ₆, lo cual además demuestra que Coq7p actúa como un importante punto de control en la síntesis de CoQ₆ (Martin-Montalvo et al., 2011). Recientemente se ha identificado la fosfatasa que lleva a cabo la desfosforilación de Coq7p, Ptc7p. La sobreexpresión de Ptc7p induce la síntesis de CoQ a través de la activación de Coq7p (Martin-Montalvo et al., 2013).

Todo esto nos lleva a pensar que es probable que existan otras proteínas Coq que puedan ser fosforiladas. Debido a su posible función nucleadora al inicio del proceso de síntesis, Coq4p es un buen candidato para estudiar posibles sitios de fosforilación y, a su vez, la fosforilación podría ayudarnos a entender la función de esta proteína.

2.1. Análisis de la secuencia de la proteína Coq4 de *S. cerevisiae* para determinar posibles sitios de fosforilación

Como acabamos de decir, la fosforilación participa de manera importante en la regulación de la síntesis de CoQ₆. Coq8p ha sido propuesta como una posible quinasa implicada en la fosforilación de algunas proteínas Coq como Coq3p, Coq5p y Coq7p (Tauche et al., 2008). Al igual que estas proteínas, Coq4p podría ser también una fosfoproteína y ser fosforilada por Coq8p o por otra quinasa. Hasta ahora, no hay indicios de que Coq8p sea responsable de la fosforilación de Coq4p debido a que no se han encontrado formas fosforiladas de esta proteína (Xie et al., 2012). Sin embargo, no

podemos descartar que Coq4p sea una fosfoproteína y que su fosforilación intervenga en la regulación de la síntesis de CoQ.

Mediante el programa GPS 2.1 (Xue et al., 2008) se analizó la secuencia de la proteína Coq4p de *S. cerevisiae* y se seleccionaron los sitios de fosforilación con mayor puntuación. El programa analiza la probabilidad de que un residuo se fosforele teniendo en cuenta la secuencia peptídica aguas arriba y aguas abajo. La puntuación (*score*) viene dada por la similitud del péptido con fosfopéptidos ya conocidos. En este caso, se seleccionaron los péptidos con una puntuación igual o mayor que seis. La tasa de falsos positivos viene dada por el valor *cutoff*, es decir, el porcentaje de falsos positivos que permitimos en el análisis. Para este análisis se seleccionó un umbral medio que permite hasta un 6%, aunque ninguno de los péptidos seleccionados superó el 5%. Los péptidos seleccionados se muestran en la Tabla 2.

Posición		Péptido	Score	Cutoff	Conservada
333	T	NSQKRATTPA*****	15,889	3,444	No
184	S	WLKRENVSPDTRAPV	15,139	3,444	Conservado
153	T	LKEQPNITTEILHMD	6	5	Conservado
154	T	KEQPNITTEILHMDK	9	5	Conservado en humano
169	T	LAKLPHNTFGYVYYQ	6,4	5	Serina en humano y ratón

Tabla 7. Residuos de la proteína Coq4p con mayor puntuación para ser fosforilables. La secuencia de la proteína se analizó mediante el programa informático GPS 2.1. Se seleccionaron los péptidos con una puntuación mayor de 6 y un umbral inferior al 6%.

A continuación, se alineó la secuencia de la proteína de levadura con la de *H. sapiens*, *M. musculus* y *C. elegans* y se seleccionaron los aminoácidos que estaban conservados, por lo que descartamos la treonina 333 y seleccionamos las demás: treonina 153, treonina 154, treonina 169 y serina 184 (Figura 17). A pesar de la que la treonina 154

sólo estaba conservada en humano y levadura, se seleccionó al estar junto a la treonina 153.

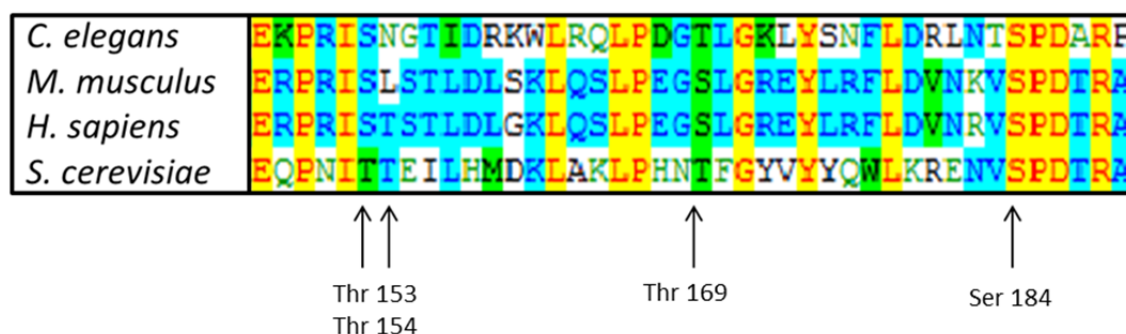


Figura 17. Alineamiento de las secuencias de Coq4p. Se alinearon las secuencias de la proteína de *S. cerevisiae*, *H. sapiens*, *M. musculus* y *C. elegans* con el programa Align X (Invitrogen). Con flechas se indican cuáles son los aminoácidos de la proteína de *S. cerevisiae* con alta probabilidad de ser fosforilados y que están conservados en las cuatro especies. En el caso de la treonina 154, al estar junto a la treonina 153, se seleccionó a pesar de estar sólo conservada en *S. cerevisiae* y *H. sapiens*.

2.2. Análisis de la estructura tridimensional de la proteína Coq4 y localización de los aminoácidos seleccionados

La estructura tridimensional de una proteína puede darnos información que, a priori, no podemos deducir de su estructura secundaria. El siguiente paso para conocer la función de los aminoácidos que hemos seleccionado fue localizarlos en la estructura tridimensional de la proteína. La estructura de la proteína Coq4 de *S. cerevisiae* no se conoce experimentalmente. Sin embargo, si se conoce la de la proteína Alr8543 de *Nostoc sp.* PCC7120, homóloga a Coq4p, que ha sido resuelta mediante cristalografía de rayos X. Esta estructura ha sido utilizada para modelar la estructura tridimensional de la proteína de *S. cerevisiae* (Rea et al., 2010). Utilizando el programa informático RasMol 2.7.5.2 (RasWin Molecular Graphics) podemos visualizar la estructura de la proteína Coq4 de *S. cerevisiae* y localizar estos aminoácidos. Como se puede observar en la Figura 18, las treoninas 153 y 154 y la serina 184 de *S. cerevisiae* aparecen muy cerca en la superficie de la proteína lo que podría indicar que forman parte de un mismo dominio, posiblemente un dominio de fosforilación. El residuo 169 también aparece en la superficie y próximo a los demás, aunque no tanto.

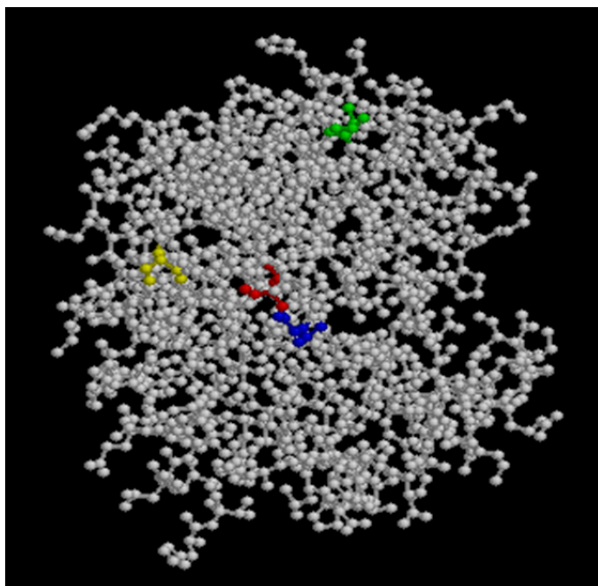


Figura 18. Modelo tridimensional de la proteína Coq4p de *S. cerevisiae*. Los aminoácidos seleccionados en *S. cerevisiae* como fosforilables se marcaron en color con el programa RasMol 2.7.5.2 (RasWin Molecular Graphics). La treonina 153 aparece en azul, la treonina 154 en rojo, la treonina 169 en verde y la serina 184 en amarillo. Se puede observar que las treoninas 153 y 154 y la serina 184 aparecen muy cerca en la estructura tridimensional por lo que podría formar parte de un mismo dominio.

Anteriormente, varios mutantes puntuales han sido descritos en Coq4p con el mismo fenotipo que el mutante nulo, no eran capaces de sintetizar CoQ₆ ni de respirar (Marbois et al., 2009). Uno de estos aminoácidos, el glutámico 226, forma parte del dominio de unión a zinc (Marbois et al., 2009). Estas tres mutaciones han sido localizadas en la estructura de la proteína (Rea et al., 2010). Cuando localizamos estos aminoácidos junto con los seleccionados para ser fosforilados podemos observar que estos aminoácidos aparecen en una región distinta a la de los aminoácidos presuntamente fosforilables (Figura 19) lo que puede indicar la existencia de dos dominios distintos en la proteína.

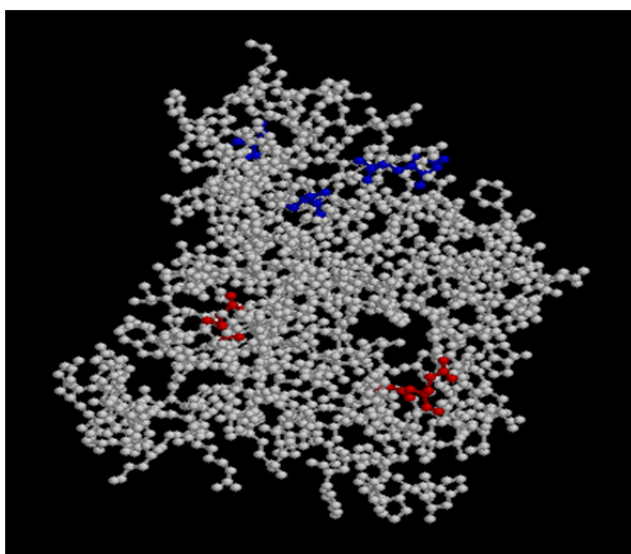


Figura 19. Localización de las distintas mutaciones puntuales en Coq4p. Los aminoácidos mutados anteriormente descritos (G120E, E121K, E226K) (Marbois et al., 2009) (en rojo) aparecen en una región distinta de la proteína a los aminoácidos presuntamente fosforilables (en azul), lo que podría indicar la existencia de dos dominios distintos en la proteína.

2.3. Caracterización *in vitro* de Coq4p como una fosfoproteína

2.3.1. Obtención de versiones modificadas del gen *COQ4*

Una vez estudiados los posibles residuos fosforilables *in silico*, hay que comprobar si realmente se fosforilan o no. Para ello se obtuvo una forma permanentemente desfosforilada de la proteína mediante la sustitución, por mutagénesis dirigida, de estos residuos por un aminoácido que no pudiera ser fosforilado y que modificara en la menor medida posible la función y estructura de la proteína. Por ello se eligió alanina para realizar esta sustitución debido a que es un residuo que no puede ser fosforilado, ya que no posee grupo hidroxilo que pueda reaccionar con el grupo fosfato, y que, debido a sus características, parece no producir muchos cambios en la proteína (Milne et al., 1992). Se obtuvieron cuatro versiones mutantes de la proteína: una con mutaciones en las treoninas 153 (A457G) y 154 (A460G), una con la mutación en la treonina 169 (A505G), una con la mutación en la serina 184 (T550G), una que contenía el cambio a alanina en las treoninas 153 y 154 y en la serina 184 y una última versión que contenía las cuatro mutaciones.

Una vez originadas, las distintas versiones fueron clonadas en el vector de expresión en bacterias pET28a fusionadas en el extremo C-terminal al epítipo V5 y a una cola de 6 histidinas. Todas las versiones se comprobaron por PCR y por secuenciación.

2.3.2. La proteína Coq4p se fosforila *in vitro*

Para demostrar que Coq4p posee residuos que realmente pueden ser fosforilados se realizó un ensayo de fosforilación *in vitro*. Tanto la versión silvestre como las versiones modificadas de la proteína fueron sobreexpresadas en la bacteria *E.coli* BL21 (DE3) pLysS fusionadas en el extremo C-terminal al epítipo V5 y a una cola de 6 histidinas para su purificación. La proteína fue purificada mediante cromatografía de afinidad y una posterior inmunoprecipitación mediante esferas de agarosa unidas a anticuerpo anti-V5. Se llevó a cabo un ensayo quinasa utilizando como sustrato la proteína purificada y una quinasa comercial como es la proteína quinasa C (PKC) en presencia de [γ -³²P]ATP para poder visualizar posteriormente los unión de grupos fosfato a la

proteína. La cantidad de proteína Coq4 que había en cada muestra se determinó mediante *Western-blot* (WB) utilizando un anticuerpo específico contra la proteína. La señal debida al $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ se normalizó con respecto a la cantidad de proteína del WB.

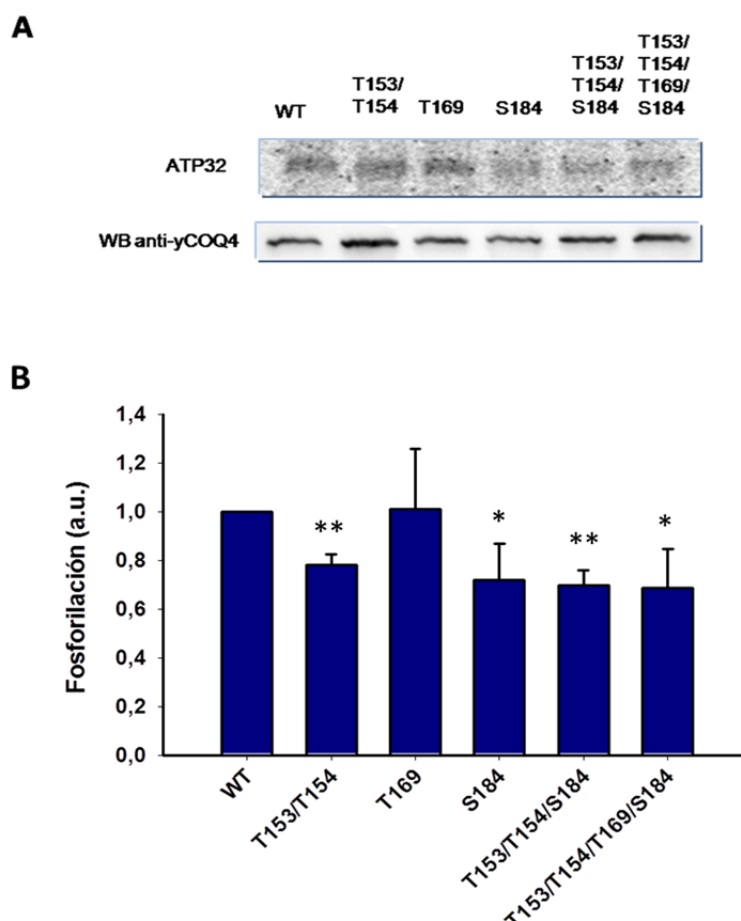


Figura 20. Ensayo de fosforilación *in vitro* de Coq4p. **A.** Fosforilación con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ de la proteína Coq4 purificada, tanto la versión silvestre (WT) como las mutantes. Como control de carga se realizó un WB para ver la cantidad de Coq4p que había en cada muestra. **B.** Normalización de los niveles de fosforilación con respecto a la cantidad de proteína Coq4. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,001$, diferencias significativas respecto al control WT.

Como se observa en la Figura 20, la versión silvestre de Coq4p se fosforila *in vitro*. Sin embargo, las versiones modificadas de la proteína presentan una disminución de la fosforilación de aproximadamente un 30%, a excepción del mutante en la treonina 169. Con esta última mutación la fosforilación no parece verse afectada. Debido a esto

y a que este aminoácido aparecía separado de los demás en la estructura tridimensional, descartamos que la treonina 169 sea un residuo fosforilable y que forme parte de este posible dominio de fosforilación. Los resultados obtenidos sugieren que los aminoácidos modificados podrían ser sujetos de fosforilación *in vivo*, aunque como se sigue observando fosforilación, no podemos descartar que existan otros residuos fosforilables.

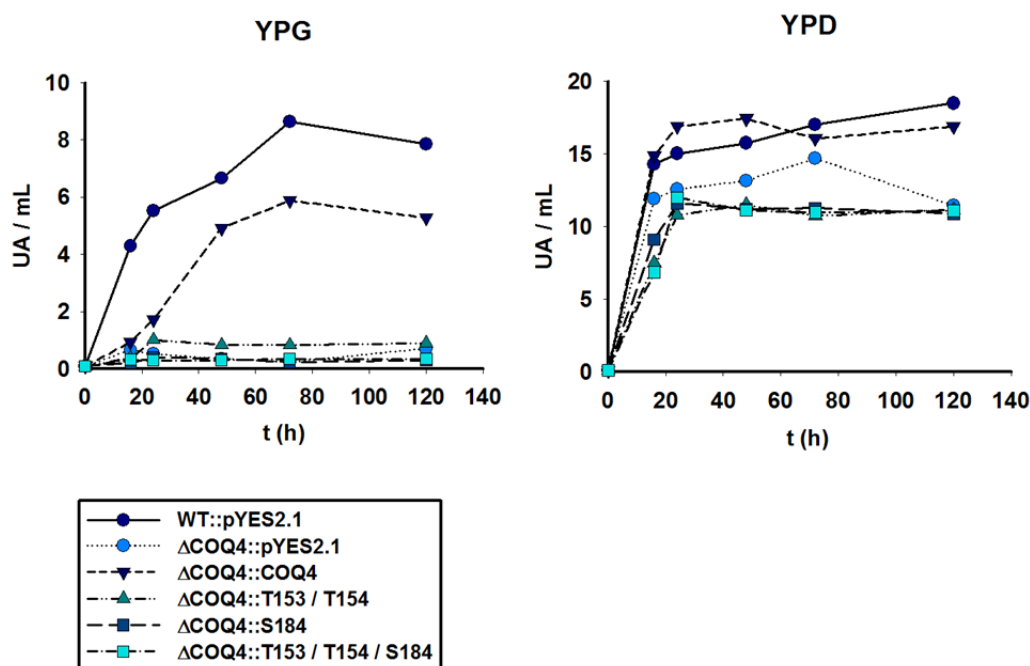
3. Efecto de las versiones modificadas de Coq4p en la levadura *S. cerevisiae*

3.1. Las versiones mutantes del gen *COQ4* no son capaces de crecer en un medio con glicerol como fuente de carbono

Una vez estudiado como afectan estas mutaciones al estado de fosforilación de Coq4p *in vitro* es necesario comprobar el efecto que tienen *in vivo*. *S. cerevisiae* es un organismo anaerobio facultativo que fermenta glucosa de forma preferente en presencia o ausencia de oxígeno pero que puede asimilar fuentes de carbono no fermentables mediante la respiración aerobia. Una de estas fuentes de carbono no fermentables es el glicerol. El glicerol se incorpora desde el medio a través de los transportadores específicos Gup1/2p. Una vez incorporado es fosforilado por la proteína Gut1p y reducido a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) por Gut2p (Oliveira and Lucas, 2004). LA DHAP entra en la glucolisis donde es convertida en piruvato. El piruvato entra en la mitocondria donde es convertido en acetil-CoA mediante la PDH y pasa al ciclo de Krebs. La respiración y la disponibilidad de CoQ son necesarias en el metabolismo del glicerol ya que el CoQ actúa como aceptor de electrones de la proteína Gut2p (Larsson et al., 1998). Por tanto, podemos utilizar el crecimiento en un medio que contenga glicerol como fuente de carbono para determinar si una levadura es capaz de respirar o no.

Debido a que Coq4p es indispensable para la síntesis de CoQ y, por tanto, para la respiración (Belogrudov et al., 2001), lo primero que hay que comprobar es si estas levaduras crecen en un medio con glicerol. Para ello se transformó una levadura mutante nulo en el gen *COQ4* con las versiones silvestre y mutadas en un plásmido de expresión en levaduras, el vector pYES2.1 TOPO[®] TA (Invitrogen). Las levaduras se cultivaron 4 horas en galactosa para inducir la expresión del gen y posteriormente se pasaron a un medio con glicerol (YPG) para ver su capacidad respiratoria. Se utilizó medio con glucosa (YPD) como control. Se observó el crecimiento tanto en medio líquido como sólido.

A



B

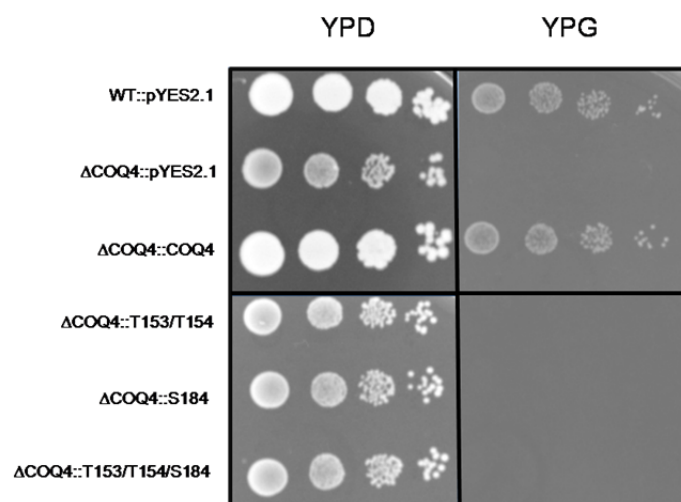


Figura 21. Crecimiento en YPG de las levaduras portadoras de mutaciones en Coq4p. Para determinar si las levaduras con las distintas versiones de Coq4p eran capaces de respirar o no se observó su crecimiento en un medio como el YPG que contiene glicerol como fuente de carbono. Como control se utilizó medio YPD que contiene glucosa al 2%. El ensayo se llevó a cabo tanto en medio líquido (A) como en medio sólido (B) y se realizó por triplicado a partir de cultivos independientes.

La levadura complementada con el gen silvestre presenta un crecimiento similar aunque un poco inferior al de la levadura silvestre en medio líquido y, por lo tanto, podemos decir que son capaces de respirar. Sin embargo, no se observa crecimiento

en el mutante nulo ni en los mutantes puntuales (Figura 21 A). Al repetir el experimento en medio sólido, el resultado es parecido, mientras que la levadura silvestre y la complementada con el gen silvestre crecen en la placa con medio YPG, las levaduras mutantes no crecen (Figura 21 B). Basándonos en estos resultados podemos decir que las levaduras portadoras de las versiones modificadas presentan una deficiencia en la respiración debido a las mutaciones en Coq4p. Probablemente esta deficiencia se debe a que las mutaciones provocan una proteína Coq4p no funcional que afecta a la síntesis de CoQ₆ como hemos visto en otros mutantes en *COQ4* (Belogrudov et al., 2001; Marbois et al., 2009).

3.2. Las versiones mutantes del gen *COQ4* no afectan a los niveles de CoQ₆.

Los mutantes en *COQ4* descritos hasta ahora, ya sea un mutante nulo como diversos mutantes puntuales (Belogrudov et al., 2001; Marbois et al., 2009), son incapaces de producir CoQ₆ y, por lo tanto, incapaces de respirar. El hecho de que los mutantes en fosforilación no puedan crecer en glicerol y que estas mutaciones estén en un gen implicado en la síntesis de CoQ₆ nos llevaría a pensar que la falta de respiración se debe a su vez a la falta de CoQ₆. Para comprobar esto, las levaduras fueron cultivadas en un medio selectivo con galactosa para inducir la expresión de las distintas versiones del gen *COQ4*. Posteriormente, para obtener suficiente cantidad de células, se cultivaron durante 72 horas en glucosa. A continuación, se realizó una extracción de lípidos a partir de mitocondrias purificadas de estas levaduras y se midió el contenido en CoQ₆.

En contra de lo esperado, las levaduras que portan las mutaciones en *COQ4* presentan niveles de CoQ₆ normales o incluso mayores que la levadura que expresa el gen silvestre (Figura 22). Es decir, estas mutaciones puntuales afectan al crecimiento en YPG y, por tanto, a la respiración de la levadura, pero no a la síntesis de CoQ₆. Por ello, no podemos decir que esta incapacidad de respirar se deba a una falta de CoQ₆ como en casos anteriormente descritos, sino que, por primera vez, encontramos mutaciones en Coq4p que afectan a la respiración independientemente de los niveles de CoQ₆. Estos resultados sugieren que Coq4p debe tener una doble función, una relacionada

con la síntesis de CoQ₆ y otra relacionada con la respiración de alguna otra forma que no conocemos aún.

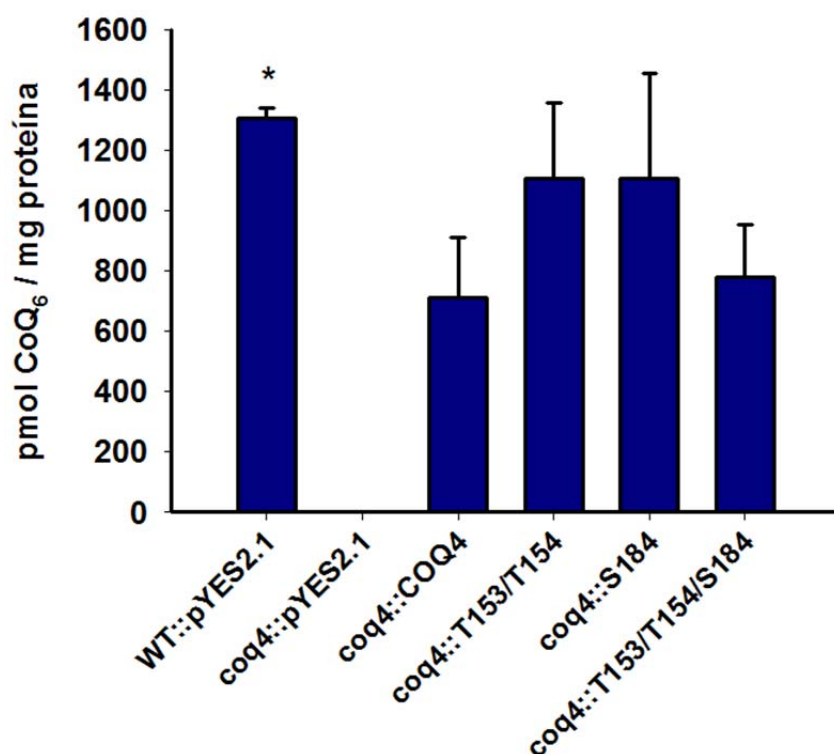


Figura 22. Niveles de CoQ₆ en la levadura *S. cerevisiae* portando las distintas versiones de Coq4p. Para determinar la cantidad de CoQ₆ se realizó una extracción de lípidos a partir de 500 µg de mitocondria de levadura y se analizó mediante HPLC. El ensayo se llevó a cabo por triplicado a partir de tres cultivos independientes. Los valores corresponden a la media ± SD de al menos tres medidas independientes expresada en pmoles de CoQ₆ / mg de proteína. *P< 0,05 respecto *coq4::COQ4*. Sólo se observaron diferencias significativas con respecto a una levadura silvestre, sin embargo, no existen diferencias al comparar los valores en las levaduras portadoras de las versiones mutantes y silvestre del gen.

3.3. Las versiones mutantes del gen *COQ4* afectan al consumo de oxígeno

Debido a que las levaduras que portan las mutaciones en *COQ4* no crecen en un medio con glicerol como fuente de carbono pero contienen CoQ₆ debemos confirmar que no son capaces de respirar. Una forma de medir *in vivo* la capacidad respiratoria de estas levaduras es la medida del consumo de oxígeno en células enteras. Mediante esta técnica podemos conocer la cantidad de oxígeno reducido por el complejo IV de la

cadena respiratoria mitocondrial gracias a las reacciones de oxidación/reducción que se producen durante la fosforilación oxidativa. Para asegurarnos de que estamos midiendo el oxígeno consumido debido a la respiración, durante el proceso se añade cianuro potásico (KCN), que inhibe el complejo IV, y así podemos determinar qué cantidad de oxígeno se reduce debido a la respiración y cuanto debido a otras vías de consumo de oxígeno.

Para medir el consumo de oxígeno se cultivaron las levaduras en medio selectivo con glucosa y, posteriormente, se cultivaron 4 horas en medio selectivo con galactosa para la expresión de los genes. Se midió el consumo de oxígeno de 3 mL de cultivo a una 1 DO_{660nm} durante 10 minutos.

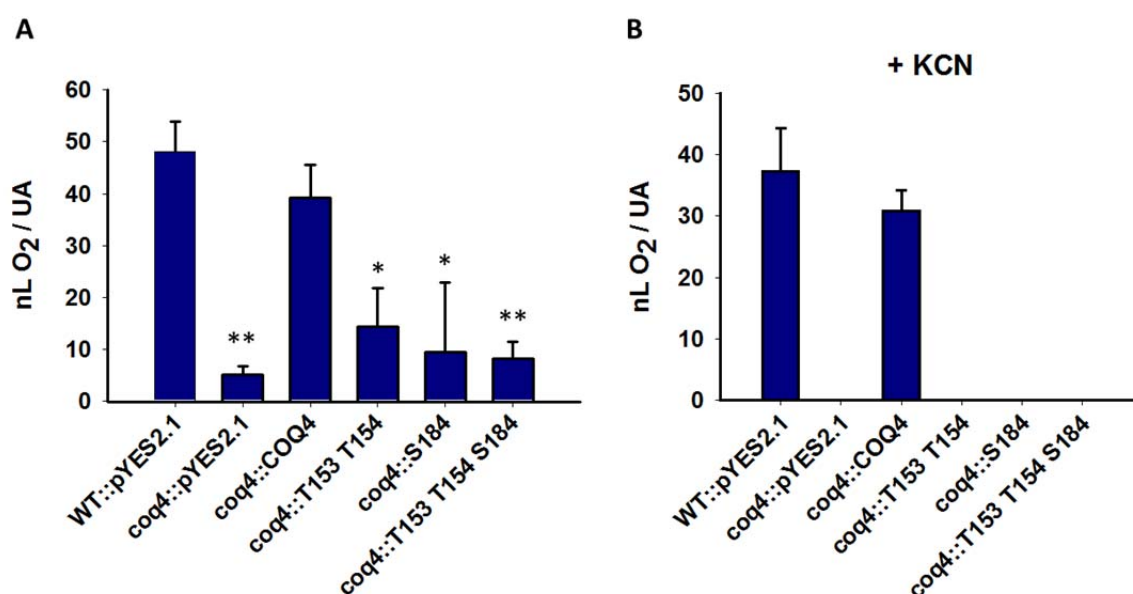


Figura 23. Consumo de oxígeno de las levaduras portadoras de las versiones mutantes de *COQ4*. El consumo de oxígeno se midió en 3 mL de medio SDc-ura 2% galactosa a 1 DO_{660nm}. Los datos corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes. Se representaron los valores antes (A) y después (B) de añadir cianuro potásico. *P<0,05 y **P<0,001, diferencias significativas con respecto al control WT::pYES2.1.

A la vista de los resultados (Figura 23 A) todas las levaduras presentaban consumo de oxígeno en mayor o menor medida aunque las que presentaban mayor consumo eran la levadura silvestre y la complementada con el gen silvestre. Al añadir KCN para descartar el consumo de oxígeno no debido a la respiración, ninguna de las levaduras

mutantes en *COQ4* presentaba consumo de oxígeno, mientras que la levadura transformada con el gen silvestre presentaba valores similares a la levadura silvestre (Figura 23 B). Estos resultados indican que sólo las levaduras que portan el gen silvestre son capaces de respirar. Por el contrario, las levaduras mutantes en *COQ4* son deficientes en respiración. El hecho de que exista consumo de oxígeno antes de añadir KCN indica que existen otras vías por las que se está consumiendo oxígeno distintas a la respiración, posiblemente debido a la formación de ROS.

3.4. Las actividades dependientes de coenzima Q de la cadena respiratoria se ven afectadas por las versiones mutantes del gen *COQ4*

Una vez que hemos medido la respiración *in vivo* podemos realizar también un ensayo *in vitro* que nos permita determinar dónde se produce el fallo que impide a las levaduras respirar. La respiración se lleva a cabo gracias al transporte de electrones a través de la cadena de transporte mitocondrial. Por lo tanto, lo primero que debemos comprobar es que ésta funcione correctamente. El CoQ₆ se encarga del transporte de electrones desde los complejos I y II al complejo III. Por esto se realizó una medida *in vitro* de la actividad de los complejos I, III y I+III. Para ello, se cultivaron las levaduras en medio selectivo con galactosa para inducir la expresión de las distintas versiones de Coq4p. Se purificó una fracción enriquecida en mitocondrias y se midieron las actividades a partir de 50 µg de cada muestra.

En todas las levaduras se observó una actividad del complejo I normal, en el caso del mutante en la serina 184 incluso superior, por lo que podemos decir que su actividad no se ve afectada por ninguna de estas mutaciones. Por el contrario, la actividad del complejo III se ve claramente afectada tanto en el caso del mutante nulo como en los mutantes puntuales. Ocurre lo mismo al medir el complejo I+III, la actividad disminuye considerablemente en todos los mutantes (Figura 24). Este resultado es fácil de explicar por la falta de CoQ₆ en el mutante nulo, ya que el CoQ₆ es necesario para la estabilidad del complejo III (Santos-Ocaña et al., 2002). Sin embargo, en los mutantes puntuales, que contienen CoQ₆, no se puede explicar la falta de actividad del complejo

III por la falta de esta molécula. Estos resultados indican que una de las funciones de Coq4p estaría relacionada con el funcionamiento del complejo III, es decir, participa en la formación del complejo de síntesis de CoQ y, además, sería necesario para la actividad del complejo III.

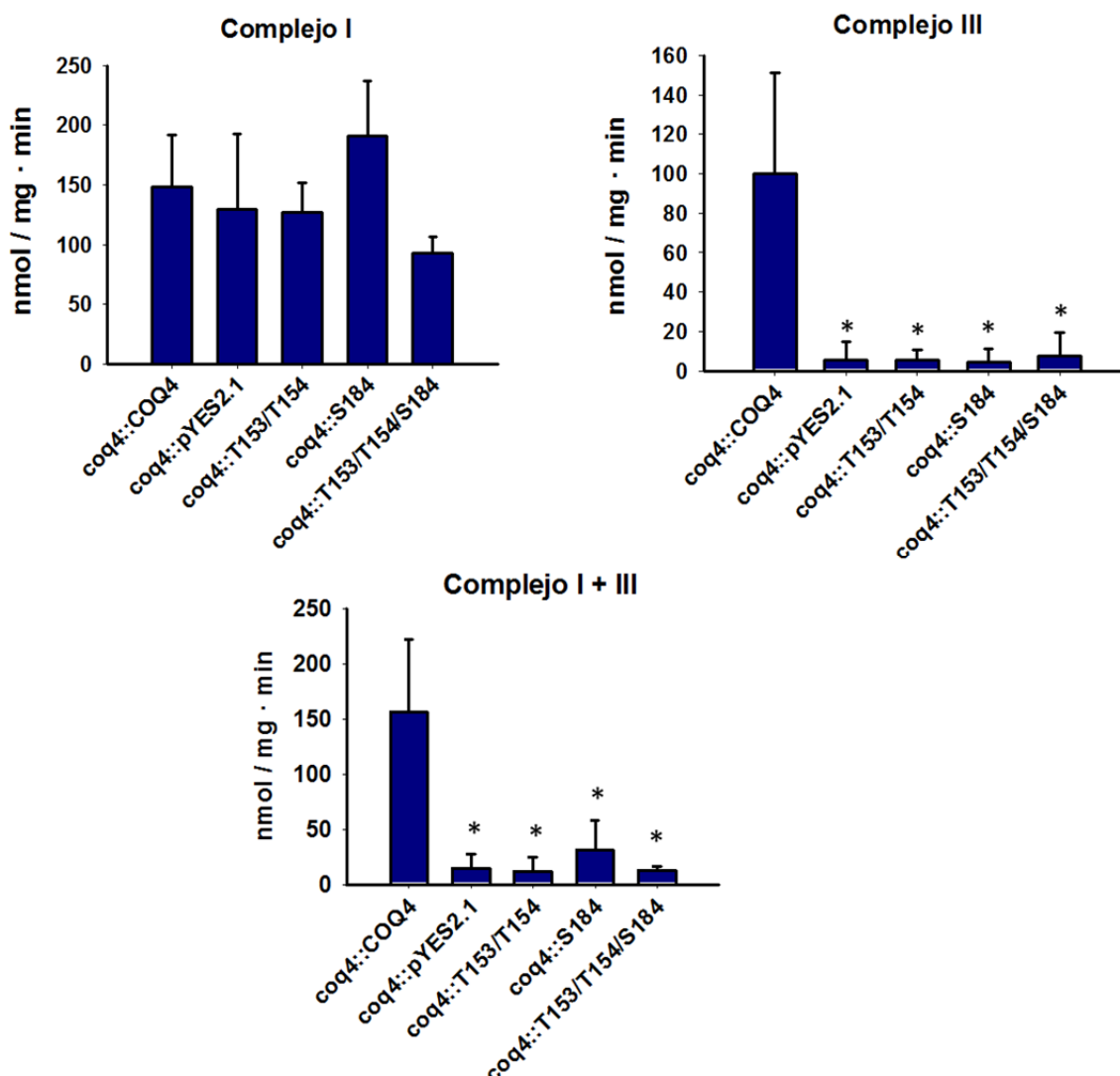


Figura 24. Actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial dependientes de CoQ₆. Las actividades indicadas en cada caso se midieron por triplicado a partir de 50 µg de proteína de mitocondria provenientes de tres cultivos independientes. Los datos mostrados corresponden a la media ± SD de al menos tres medidas independientes de la actividad expresada en nmol/mg de proteína·min. *P<0,05, diferencia significativa respecto al control coq4::COQ4.

3.5. Estado redox del coenzima Q mitocondrial en los mutantes puntuales

Las mutaciones puntuales en *COQ4* afectan de alguna manera a la actividad del complejo III. El complejo III es el encargado de transportar los electrones desde el CoQ hasta el citocromo c. Para ello el CoQ debe haber sido previamente reducido por los complejos I y II de la cadena respiratoria. Nuestros mutantes puntuales no presentan actividad en el complejo III por lo que cabe pensar que estas mutaciones impiden a Coq4p cumplir una función relacionada con este complejo y que es necesaria para su actividad. Otra opción es que estas mutaciones en Coq4p impidan su interacción con el complejo I o II y por ello el CoQ₆ no puede reducirse y un exceso de CoQ₆ oxidado esté bloqueando la transferencia de electrones hasta el complejo III. Para descartar que el problema sea un exceso de CoQ₆ oxidado se midió el estado redox del CoQ₆ en la mitocondria, es decir el ratio entre la forma reducida y la oxidada. Para ello se realizó una extracción rápida del CoQ₆ total (ver Medida del ratio CoQ reducido/oxidado en materiales y métodos) a partir de 200 µg de mitocondria pero en presencia de un agente reductor como es el β-mercaptoetanol en la extracción lipídica para impedir que el CoQ₆ se reduzca y varíe la proporción entre las dos formas.

En los resultados se puede observar que las levaduras portadoras de las versiones mutadas de Coq4p presentan unos niveles mayores de CoQ₆ tanto oxidado como reducido con respecto a la levadura que porta la versión silvestre, como habíamos visto anteriormente. Además, este incremento se observa sobre todo en el CoQ₆ reducido por lo que parece que las mutaciones en *COQ4* no afectan a la reducción del CoQ₆ sino que aumentan los niveles (Figura 25 A). Para ver mejor la proporción entre las dos formas del CoQ₆ representamos el ratio CoQ reducido/oxidado y observamos, que aunque ligeramente, la cantidad de CoQ₆ reducido frente al oxidado aumenta (Figura 25 B). Esto indica que hay siempre más poder reductor acumulado disponible para ser transferido al complejo III o para producir ROS. Por lo tanto, las mutaciones en *COQ4* afectan directamente al funcionamiento del complejo III.

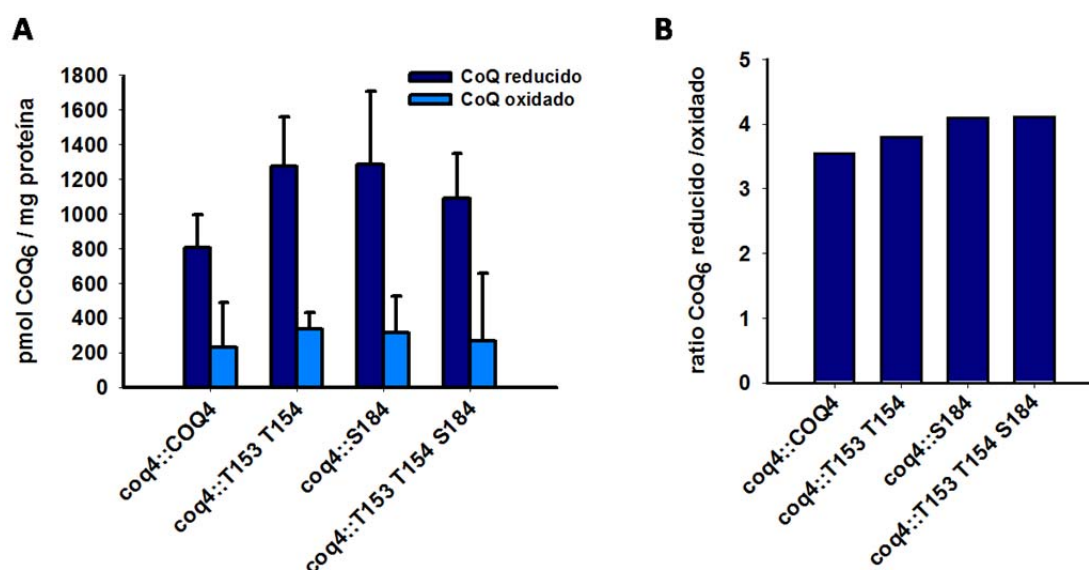


Figura 25. CoQ₆ reducido/oxidado. Para no alterar la proporción de CoQ₆ reducido/oxidado se llevó a cabo una purificación de mitocondrias seguida inmediatamente después de una extracción de lípidos en presencia de β -mercaptoetanol para evitar que el CoQ₆ reducido se oxidara. A continuación se analizaron las muestras mediante HPLC. **A.** Niveles de CoQ₆ oxidado y reducido en cada una de las levaduras. La medida de CoQ₆ se repitió tres veces a partir de cultivos independientes. Los valores corresponden a la media \pm SD de al menos tres medidas expresada en pmoles de CoQ₆ / mg de proteína. **B.** Ratio CoQ₆ reducido/oxidado.

3.6. Producción de radicales libres en las levaduras mutantes en *COQ4*

Hasta ahora sabemos que las levaduras portadoras de las versiones modificadas de Coq4p sintetizan CoQ₆ y este está en su mayor parte en forma reducida. Por otro lado, el complejo III no presenta actividad, por lo que podemos preguntarnos qué ocurre con este poder reductor que no es transferido de forma adecuada al complejo III. Este puede ser consumido en la generación de ROS por lo que medimos generación de radicales libres tanto en células enteras como en la mitocondria.

3.6.1. Producción de radicales libres en células enteras

La producción de radicales libres en las levaduras puede medirse mediante citometría de flujo añadiendo determinados compuestos como el hidroetidio. Este puede ser oxidado por el anión superóxido hasta etidio, el cual puede unirse al ADN de forma permanente. Este compuesto nos da información sobre el estrés oxidativo a nivel general en la célula. A partir de un cultivo de levaduras en medio selectivo se diluyó a

0,1 DO₆₆₀ en PBS. Se añadió dihidroetidio 0,5 μ M y se incubó 30 minutos a 30°C. Posteriormente se analizó por citometría de flujo mediante un equipo Coulter Epics XL utilizando un láser de argón a una longitud de onda de 488 nm para excitar el etidio y detectando la fluorescencia emitida a 590 nm (FL3). La presión del fluido se ajustó hasta la detección de 200 eventos por segundo aproximadamente.

En los resultados (Figura 25) se observa que no existe una tendencia clara de las células a producir más superóxido que una levadura silvestre por lo que, en principio, no parece existir más estrés oxidativo en las levaduras mutantes.

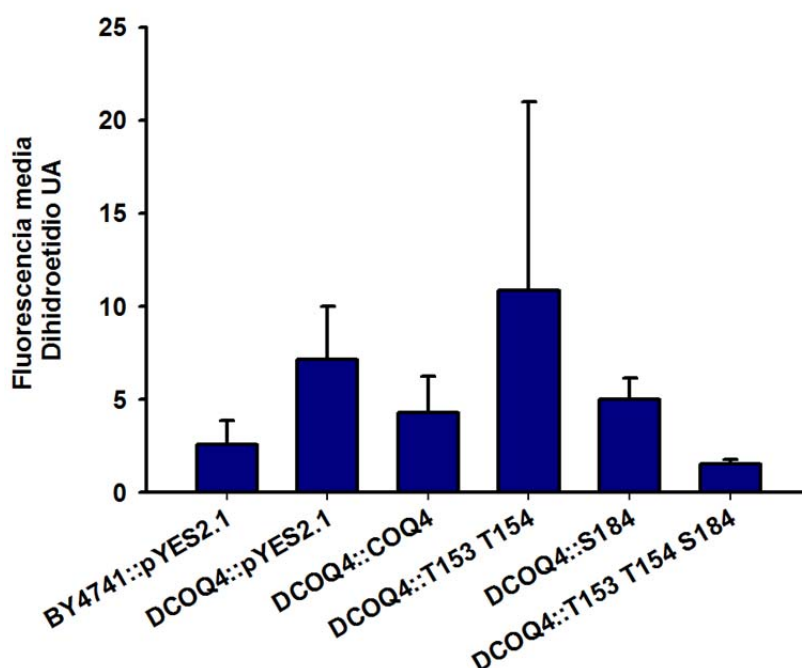


Figura 25. Producción de radicales libres en células enteras mediante citometría de flujo. Las células se incubaron con dihidroetidio 5 μ M y se analizaron mediante citometría de flujo. La medida de fluorescencia se repitió tres veces a partir de cultivos independientes. Los valores corresponden a la media \pm SD.

3.6.2. Producción de superóxido mitocondrial

Otra forma de comprobar la producción de ROS en la mitocondria es hacerlo midiendo la reducción de citocromo c acetilado. El citocromo c normalmente es reducido por el complejo III en la cadena de transporte mitocondrial, sin embargo, el citocromo acetilado no puede ser reducido por este complejo, sólo se reduce en presencia de

anión superóxido. Por tanto, podemos considerar que la reducción de citocromo *c* acetilado es proporcional a la cantidad de superóxido. El protocolo es muy similar al de medida de la actividad del complejo III pero añadiendo citocromo *c* acetilado como aceptor de electrones y partiendo de 100 µg de proteína de mitocondria. Como control de que el método funciona para medir producción de superóxido añadimos CoQ₀ que genera estrés oxidativo. El CoQ₀ es igual a la molécula de CoQ pero no tiene cola isoprenoide. Esta molécula no se reduce completamente y forma el radical semiquinona que reacciona con el oxígeno y genera radical superóxido.

Muestra	Reducción citocromo <i>c</i> acetilado (nmol/mg min)	+CoQ ₀ (nmol/mg min)	Actividad CIII (nmol/mg min)
WT::pYES2.1	1,7 ± 0,9	194,6 ± 0,8	99,9 ± 51,4
ΔCOQ4::pYES2.1	2,3 ± 1,0	190,2 ± 11,4	5,4 ± 9,4
ΔCOQ4::COQ4	1,1 ± 0,2	176,0 ± 9,2	5,5 ± 5,2
ΔCOQ4::T153 T154	2,6 ± 0,7	183,9 ± 9,1	4,5 ± 6,9
ΔCOQ4::S184	2,5 ± 1,4	190,4 ± 1,6	7,5 ± 11,9
ΔCOQ4::T153 T154 S184	1,1 ± 0,7	186,8 ± 9,1	4,7 ± 8,2

Tabla 8. Producción de superóxido mitocondrial. La producción de superóxido se obtuvo de manera indirecta mediante la medida de la reducción del citocromo *c* acetilado. La medida se llevó a cabo por duplicado a partir de 100 µg de proteína de mitocondria provenientes de dos cultivos independientes. Los datos mostrados corresponden a la media ± SD de al menos dos medidas independientes expresada en nmol/mg de proteína·min.

Los resultados indican que ninguna de las levaduras presenta producción de superóxido (Tabla 8). La adición de CoQ₀ demuestra que el método funciona correctamente ya que se detecta la producción de superóxido. A pesar de que las levaduras mutantes, tanto el mutante nulo como los puntuales, poseen una disfunción en la cadena de transporte mitocondrial, esto no conlleva a la generación de estrés oxidativo en la mitocondria.

3.7. Suplementación con CoQ₆ de mutantes en genes COQ

La suplementación con CoQ₆ ha servido para rescatar el crecimiento de algunos de los mutantes *coq* en medios con una fuente de carbono no fermentable. Por ejemplo, la

adición de CoQ₆ al medio sirve para restaurar respiración en un mutante nulo *coq7* aunque esto depende de la estirpe (Santos-Ocaña et al., 2002). Como se ha dicho anteriormente, los mutantes nulos *coq3-coq9* acumulan un mismo intermediario temprano de la síntesis, el HHB (Poon et al., 1997). La suplementación con CoQ₆ permite la acumulación de otros intermediarios más tardíos de la síntesis como la acumulación de DMQ₆ en el mutante *coq7* (Padilla et al., 2009) o, en el caso de *coq4*, de HHAB (He et al., 2014). Además, estabiliza en parte los niveles de algunas proteínas de la síntesis como ocurre con Coq4p en los mutantes *coq3*, *coq6* y *coq7* (He et al., 2014).

Algunos autores proponen que la suplementación rescata el fenotipo de todos los mutantes *coq*, sin embargo, no hay datos publicados referentes al caso de *COQ4*. Teniendo esto en cuenta, y partiendo de la idea de que Coq4p es necesaria para la formación del complejo de síntesis, podemos preguntarnos si la adición al medio de CoQ₆ tiene el mismo efecto en un mutante *coq4* que en otros mutantes *coq*. Se ha observado que un mutante *coq7* recupera la capacidad de crecer en un medio con una fuente de carbono no fermentable como es el glicerol cuando se añade CoQ₆ al medio (Santos-Ocaña et al., 2002). Por ello utilizamos este mutante nulo como control de levaduras que sí son capaces de respirar utilizando CoQ₆ exógeno. Además utilizamos un mutante *coq5* como un segundo control.

Además de un mutante nulo *coq4* utilizamos también distintos mutantes puntuales. Hasta ahora, los mutantes puntuales descritos en *COQ4* presentaban el mismo fenotipo, deficiencia de CoQ₆. Por ejemplo, el mutante *coq4-1* no contiene CoQ₆ y por lo tanto no es capaz de crecer en un medio con glicerol como fuente de carbono (Belogrudov et al., 2001). Además, esta mutación afecta a la formación del complejo de síntesis impidiendo la presencia de Coq3p y Coq7p en el complejo de alto peso molecular de 1,3 MDa (Marbois et al., 2009). Por otra parte, los mutantes puntuales en fosforilación en *COQ4* presentan niveles normales de CoQ₆ por lo que podemos suponer que Coq4p, a pesar de las mutaciones, cumple su función nucleadora y el complejo de síntesis se forma. Sin embargo, no poseen actividad en el complejo III, lo cual indica que Coq4p es necesario para esta actividad. El hecho de que existan estos

dos tipos de mutantes encaja con la idea de que Coq4p podría tener dos funciones y cada uno de los mutantes se vería afectado en una de ellas. Por ello, resulta interesante observar el efecto de la suplementación en ambos casos, por lo que se utilizará el mutante *coq4-1* además de los mutantes en fosforilación.

Las levaduras fueron previamente cultivadas en medio YPD o medio selectivo con glucosa y posteriormente en medio YPG al que se añadió CoQ₆ 2μM partiendo de 0'1 DO_{660nm}. La DO_{660 nm} se midió a lo largo de varios días para comprobar el crecimiento de los distintos cultivos.

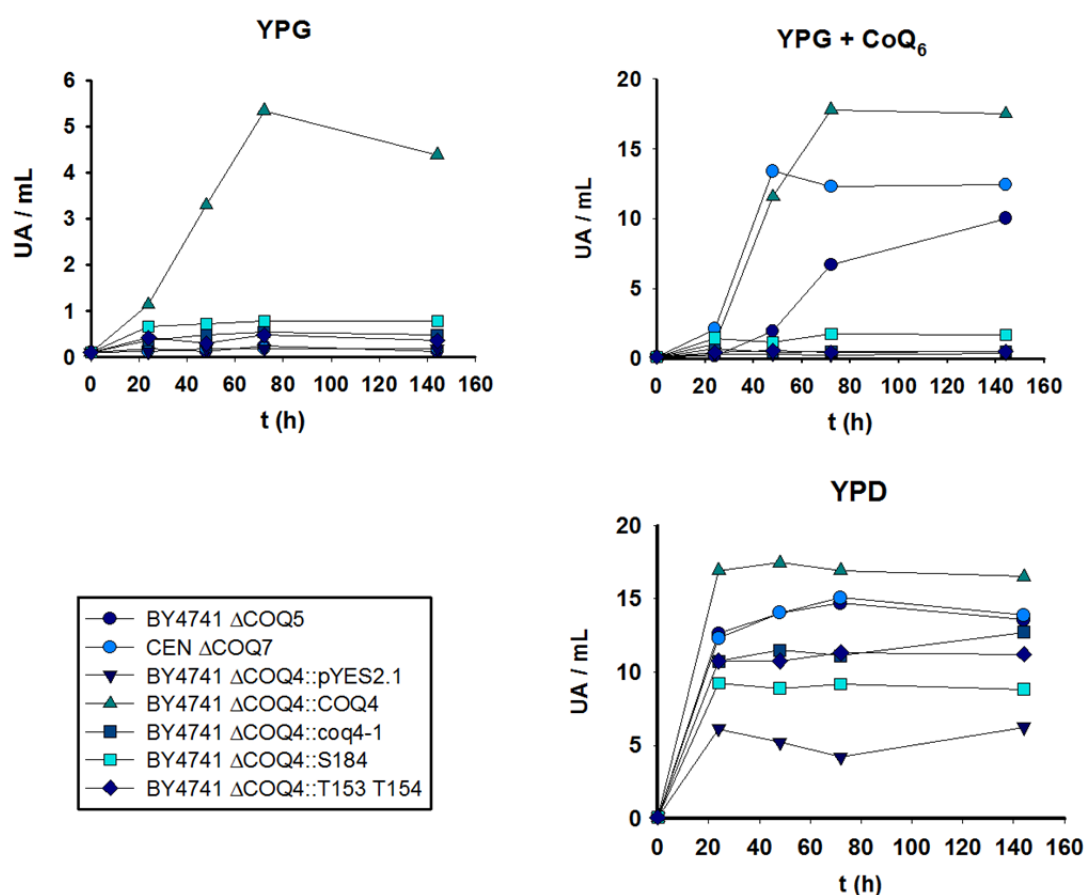


Figura 27. Crecimiento en medio YPG suplementado con CoQ₆. Las levaduras se cultivaron en medio YPG líquido con y sin CoQ₆ 2 μM durante 6 días. Para determinar el crecimiento se midió la DO_{660nm} de cada cultivo a lo largo del tiempo.

Según se observa en la Figura 27 sólo la levadura que contenía la versión silvestre de *COQ4* fue capaz de crecer en YPG mientras que no se observó crecimiento en ninguno de los mutantes. Cuando se añadió al medio CoQ₆ 2μM, tanto el mutante *coq7* como el

coq5, recuperaron la capacidad de crecer en glicerol y, por tanto, la respiración. Por el contrario, ninguno de los mutantes en *coq4* fue capaz de crecer. En el mutante nulo y en *coq4-1* este resultado podría explicarse por la falta de complejo de síntesis debido a la ausencia de una proteína Coq4 funcional que hace que, aunque haya CoQ₆, este no este disponible para transferir los electrones en la cadena respiratoria mitocondrial. Sin embargo, en los mutantes en fosforilación existe complejo de síntesis pero este tampoco es suficiente para que el CoQ₆ restaure la respiración. Es decir, no es el complejo de síntesis en sí, sino que es el propio Coq4p quien es necesario para el funcionamiento del complejo III, ya sea activándolo o haciendo disponible el CoQ₆ para que este pueda cederle los electrones.

3.8. Incorporación de COQ₆ en la estirpe BY4741 de *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae* existe un transporte de CoQ₆ exógeno desde el medio de cultivo a la mitocondria, sin embargo, este proceso es dependiente de la estirpe y no se produce en todas ellas (Padilla-López et al., 2009; Santos-Ocaña et al., 2002). Para comprobar que la estirpe BY4741 es capaz de incorporar el CoQ₆ exógeno a la mitocondria y descartar que este sea el problema en los mutantes *coq4*, se cultivaron levaduras mutantes *coq5*, que son capaces de crecer en YPG suplementado con CoQ₆ 2μM, y *coq4* en medio YPD con y sin CoQ₆. Posteriormente se purificó una fracción enriquecida de mitocondrias, se llevó a cabo una extracción de lípidos y se cuantificó el contenido en CoQ₆ de las muestras.

A la vista de los resultados (Figura 28), el mutante *coq4* no sólo es capaz de incorporar CoQ₆ a la mitocondria sino que el contenido es mayor que en el mutante *coq5*. Esto quiere decir que el mutante *coq4*, aunque lo incorpora, no es capaz de utilizar este CoQ₆ para restaurar la respiración y crecer en YPG. Esto puede deberse a que, como hemos visto en el apartado anterior en el caso de las versiones modificadas (Figura 27), Coq4p es necesario para la actividad del complejo III aunque haya CoQ₆ disponible por lo que, aunque añadamos CoQ₆ a cualquiera de los mutantes *coq4*, la levadura es incapaz de respirar.

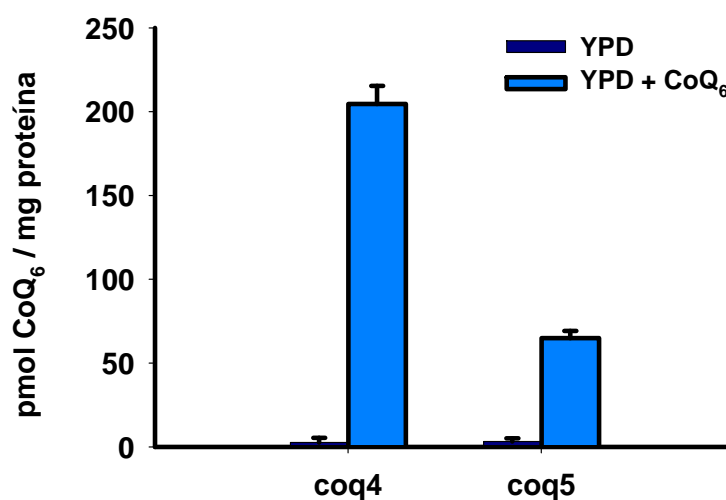


Figura 28. Incorporación de CoQ₆ a la mitocondria. Una vez cultivadas las levaduras en medio YPD suplementado con 2 μ M de CoQ₆ se purificaron mitocondrias, se llevó a cabo una extracción de lípidos y se midió el contenido en CoQ₆ de cada muestra. La medida de CoQ₆ se llevó a cabo por duplicado en cada experimento y se repitió tres veces a partir de cultivos independientes. Los valores corresponden a la media \pm SD de al menos tres medidas expresada en pmoles de CoQ₆ / mg de proteína.

4. Formación del complejo de síntesis en levaduras portadoras de las mutaciones en Coq4p.

4.1. Niveles de expresión de proteínas Coq en levaduras portadoras de las mutaciones en Coq4p.

Hasta ahora, los resultados obtenidos parecen indicar que Coq4p posee una doble función, por un lado participa en la síntesis de CoQ₆ y por otro es necesaria para la actividad del complejo III. Las levaduras mutantes en fosforilación parecen verse afectadas en esta segunda función pero no en la síntesis de CoQ₆ ya que poseen niveles de esta molécula normales o incluso mayores que una levadura silvestre. Por ello, debemos pensar que el complejo de síntesis se forma correctamente en estas levaduras. Para comprobarlo lo primero que debemos hacer es estudiar cómo se encuentra el complejo en estas levaduras.

Como se ha comentado anteriormente, la ausencia de algunas proteínas Coq o determinadas mutaciones puntuales en éstas producen la disminución de los niveles de otras de las proteínas del complejo como ocurre en algunos mutantes *coq4* (Belogradov et al., 2001; Marbois et al., 2009). Por esto, los niveles de estas proteínas en las levaduras portadoras de las mutaciones en *COQ4* pueden darnos una idea de cómo afectan estas al mantenimiento del complejo de síntesis. Para ello las levaduras se cultivaron en medio selectivo con galactosa para inducir la expresión de las distintas versiones de *COQ4* y mediante fraccionamiento se obtuvo una fracción enriquecida en mitocondria. Se analizaron 50 µg de proteína de cada muestra de mitocondria mediante WB SDS-PAGE utilizando anticuerpos específicos contra Coq4p, Coq3p y Coq8p.

Como se puede observar en la Figura 29, los niveles de proteína Coq3 disminuyen ligeramente en todos los mutantes en *COQ4* siendo esta disminución mayor en el mutante nulo. Lo mismo ocurre con Coq8p, llegando casi hasta desaparecer en el mutante nulo. Sin embargo, en los mutantes puntuales los niveles de Coq8p se mantienen. La presencia de Coq3p y Coq8p en las levaduras que contienen las

versiones mutantes de *COQ4* sugiere que puede formarse complejo de síntesis de CoQ, al contrario de lo que ocurre en el mutante nulo, lo cual coincide con el hecho de que estas levaduras sean capaces de sintetizar CoQ₆.

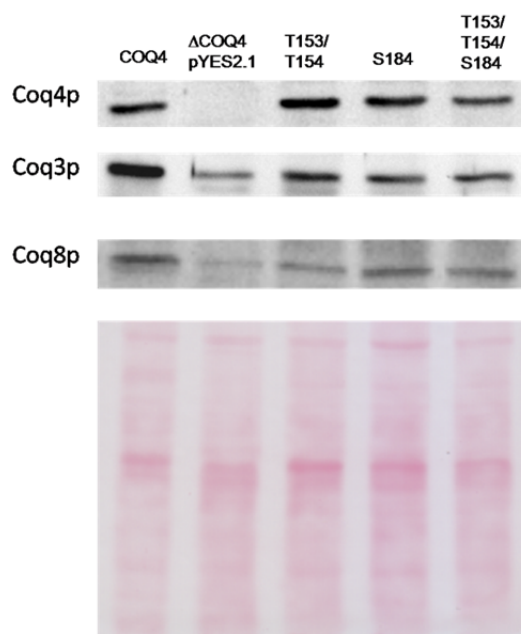


Figura 29. Niveles de proteínas Coq en los distintos mutantes en Coq4p. Mitocondrias purificadas portando las distintas versiones de Coq4p fueron analizadas mediante SDS-PAGE y WB utilizando anticuerpos específicos contra las proteínas Coq3, Coq4 y Coq8. Como control de carga se muestra abajo una imagen de la membrana teñida con rojo Ponceau.

4.2. Estudio de la formación del complejo de síntesis de CoQ mediante la sobreexpresión de Coq8p

Ya hemos comprobado el efecto de la expresión de *COQ8* en los mutantes nulos *coq4* y *coq7*. En el mutante *coq7* esta sobreexpresión produce la acumulación de DMQ₆, es decir, parece rescatar su función estructural y el complejo de síntesis se forma, pero no la catalítica (Padilla et al., 2009). Por el contrario, en el caso del mutante *coq4*, la sobreexpresión de *COQ8* no produce ningún efecto, quizás porque Coq4p actúa previamente a la acción de Coq8p o simplemente porque estas dos proteínas no guardan una relación directa. Debido a que Coq4p parece ser esencial para la formación del complejo de síntesis, parece interesante observar el efecto de la sobreexpresión de Coq8p en un doble mutante de levadura *coq4/coq7* y comprobar si se sigue produciendo la formación de complejo en ausencia de Coq4p.

Para ello, a partir de un mutante *coq7* se obtuvo por inserción un doble mutante *coq4/coq7*. Levaduras delecionadas en uno o los dos genes fueron transformadas con el gen *COQ8* en el plásmido multicopia PRS425 (Padilla et al., 2009). Las levaduras fueron cultivadas en medio selectivo con glucosa ya que todas eran deficientes en respiración. Se purificó una fracción enriquecida de mitocondria de las levaduras y se realizó una extracción de lípidos para su posterior análisis mediante HPLC.

Los resultados muestran que la sobreexpresión de Coq8p en ausencia de Coq4p no produce acumulación de DMQ₆ ni en presencia ni en ausencia de Coq7p (Figura 30) por lo que podemos suponer que no se existe complejo de proteínas y que la síntesis de CoQ₆ se detiene en etapas tempranas. Esto coincide con los resultados mostrados por Xie (Xie et al., 2012) en los que analizan los intermediarios acumulados sobreexpresando Coq8p y observan que en el caso del mutante *coq4* sólo se acumula HHAB, un intermediario temprano de la síntesis, a partir de p-ABA. Con estos resultados podemos concluir que Coq4p es imprescindible para la formación del complejo de síntesis y que la sobreexpresión de Coq8p es incapaz de suprimir la falta de Coq4p en cualquier caso.

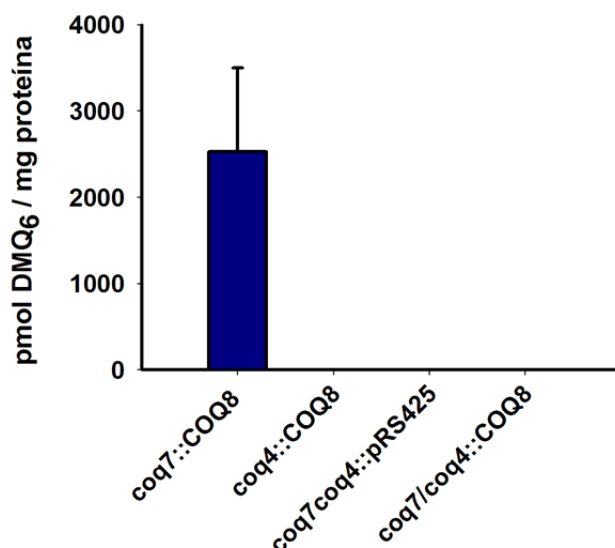


Figura 30. Niveles de DMQ₆ en los distintos mutantes tras la sobreexpresión de Coq8p. Para determinar la cantidad de DMQ₆ se realizó una extracción de lípidos a partir de 500 µg de mitocondria de levadura y se analizó mediante HPLC. La medida de DMQ se llevó a cabo por duplicado en cada experimento y se repitió tres veces a partir de cultivos independientes. Los valores corresponden a la media ± SD de al menos tres medidas expresada en pmoles de

DMQ / mg de proteína.

4.3. La sobreexpresión de Coq8p no rescata la respiración en las levaduras con mutaciones puntuales en *COQ4*

La sobreexpresión de Coq8p no es capaz de suprimir la ausencia de Coq4p en la formación del complejo, sin embargo, podemos pensar que, en los mutantes puntuales que si son capaces de formar complejo y sintetizar COQ₆, la sobreexpresión de esta proteína podría rescatar la respiración. Los residuos mutados en Coq4p son presuntos sitios de fosforilación por lo que la falta de respiración en estas levaduras podría deberse a que Coq4p necesita estar fosforilada pero no puede hacerlo. Coq8p es una presunta quinasa necesaria para la fosforilación de varias proteínas de la síntesis de CoQ como Coq3p, Coq5p y Coq7p (Tauche et al., 2008) por lo que su sobreexpresión podría rescatar la respiración debida a la falta de fosforilación en estos residuos. Para comprobarlo levaduras delecionadas en *COQ4* fueron transformadas con *COQ8* en el plásmido multicopia pRS425 y las distintas versiones mutadas de *COQ4* en el pYES2.1. Las levaduras se cultivaron en medio selectivo con galactosa para la sobreexpresión de Coq4p y posteriormente se sembraron diluciones seriadas de cada cultivos en placas de YPG e YPD.

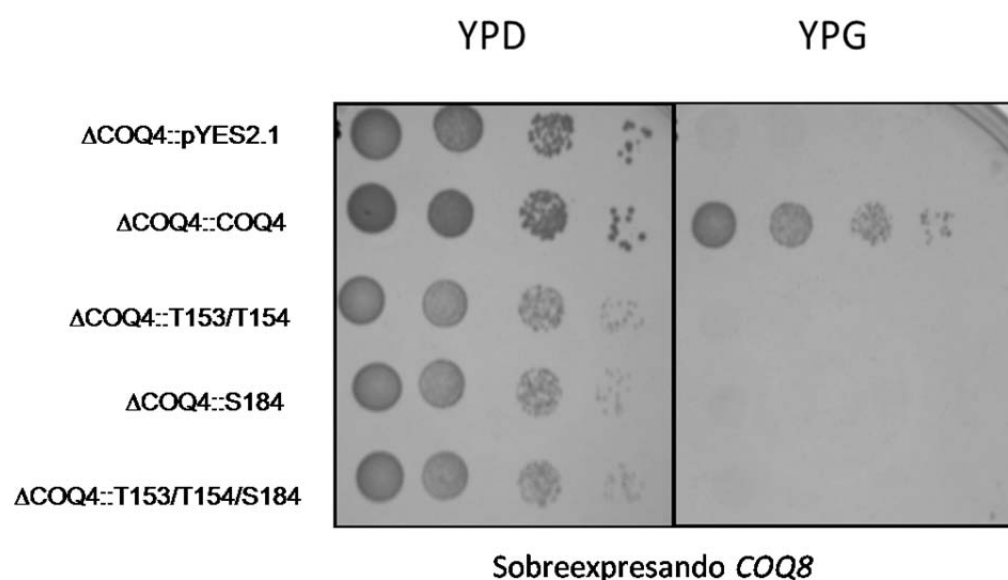


Figura 31. Crecimiento en medio YPG de las levaduras sobreexpresando Coq8p. Las levaduras portadoras de las distintas versiones de Coq4p fueron transformadas con Coq8p en un plásmido multicopia. Para ver si recuperaban la capacidad de respirar se sembraron

diluciones seriadas del cultivo en placas de medio sólido YPG e YPD y se dejaron crecer durante 72 horas a 30°C.

Sólo la levadura que contenía la proteína Coq4 silvestre fue capaz de crecer en medio con glicerol (Figura 31), lo que indica que la sobreexpresión de Coq8p no permite a la levadura respirar cuando Coq4p está mutado en estos residuos. Este resultado puede tener varias explicaciones, por ejemplo, que Coq4p sea necesaria en un paso anterior a la actuación de Coq8p, que Coq8p no sea la quinasa encargada de fosforilar Coq4p, o que estas dos proteínas actúen de manera independiente, por lo que un exceso de Coq8p no afecte a la función de Coq4p. Por otra parte, hemos visto que el defecto en la respiración de estas levaduras se debe a la ausencia de actividad del complejo III. Otra posible explicación es que estos residuos modificados son esenciales para el funcionamiento del complejo III y Coq8p no tenga relación con esto.

4.4. Formación del complejo de síntesis en un mutante *coq7* portando las versiones modificadas de Coq4p sobreexpresando Coq8p

Como hemos dicho existen dos tipos de mutantes en *COQ4*, aquellos como *coq4-1* que no son capaces de formar el complejo de síntesis de CoQ y por tanto no sintetizan CoQ₆, y aquellos que si forman este complejo y sintetizan CoQ₆ pero presentan un defecto en la actividad del complejo III.

Para corroborar la formación del complejo en los mutantes en fosforilación y observar la diferencia con el mutante *coq4-1* podemos utilizar la sobreexpresión de Coq8p en un mutante *coq7* con las distintas versiones de *COQ4*. Para ello se utilizó el doble mutante *coq4/coq7* que sobreexpresa *COQ8* en el plásmido multicopia pRS425 y se transformó con las distintas versiones de *COQ4* en el plásmido pYES2.1. Las levaduras se cultivaron en medio selectivo con galactosa para inducir la expresión de *COQ4* y se purificó una fracción enriquecida en mitocondrias. Por un lado se realizó una extracción de lípidos a partir de 500 µg de proteína de cada muestra de mitocondrias y se analizó el contenido en DMQ₆. Por otro lado, se analizó también los niveles de otras proteínas del complejo mediante WB considerando el mantenimiento de los niveles de estas proteínas como prueba de la formación del complejo, ya que, como se ha dicho antes, la desestabilización del complejo afecta a los niveles de algunas proteínas.

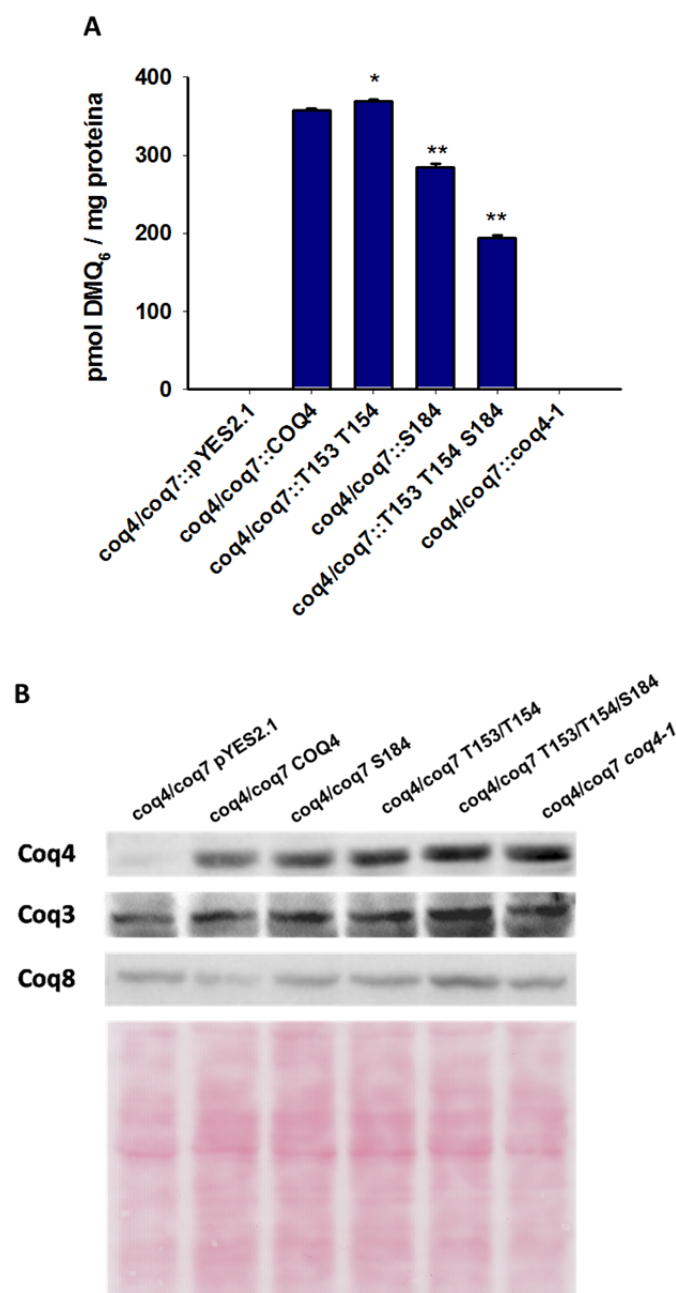


Figura 32. Formación del complejo de síntesis en los mutantes *coq4/coq7* sobreexpresando *Coq8p*. Se utilizó un doble mutante *coq4/coq7* al que se transformó con las distintas versiones de *Coq4p* y *Coq8p* en un plásmido multicopia. **A.** Se analizaron los niveles de DMQ₆ mediante HPLC a partir de una extracción de lípidos de mitocondrias purificadas. La medida de DMQ₆ se llevó a cabo por duplicado en cada experimento y se repitió tres veces a partir de cultivos independientes. Los valores corresponden a la media \pm SD de al menos tres medidas expresada en pmoles de DMQ₆ / mg de proteína. * $P < 0,001$ diferencias significativas respecto al control *coq4/coq7::COQ4*. **B.** Las mismas muestras de mitocondria se analizaron mediante WB utilizando anticuerpos específicos contra *Coq3p*, *Coq4p* y *Coq8p*. Como control de carga se utilizó la membrana teñida con rojo ponceau.

Con respecto a los niveles de DMQ₆, tanto la levadura con el gen silvestre como los mutantes en fosforilación acumulan este compuesto (Figura 32 A). Esto quiere decir que el complejo de proteínas está formado y la síntesis se lleva a cabo hasta el paso catalizado por Coq7p, que está ausente. El hecho de utilizar levaduras sin proteína Coq7p se debe precisamente a que podemos utilizar la acumulación de DMQ₆ como prueba de la formación del complejo de síntesis. Por lo tanto, estas mutaciones en *COQ4* no afectan a la formación del complejo de síntesis de CoQ₆. Por el contrario, en el mutante *coq4-1*, al igual que en el mutante nulo, no se produce DMQ₆, por lo que esta mutación si afecta a la proteína en su función relacionada con la estabilización del complejo. Al observar los niveles de proteínas (Figura 32 B), estos disminuyen drásticamente en el mutante nulo como era de esperar, pero se mantienen en todos los mutantes puntuales, disminuyendo ligeramente en el mutante *coq4-1*. Esto último puede explicarse porque, aunque la proteína mutada no permita que exista complejo en el mutante *coq4-1*, a diferencia de lo que ocurre en el mutante nulo, el hecho de que Coq4p esté presente aunque no sea funcional puede ayudar a estabilizar otras proteínas. En los mutantes en fosforilación, el complejo se forma y, por tanto, los niveles de proteína se mantienen igual que en el silvestre. Por consiguiente, además de confirmar que nuestros mutantes no se ven afectados en el complejo de síntesis, podemos concluir que existen dos tipos de mutantes puntuales: aquellos que impiden la síntesis de CoQ₆ y, como consecuencia la respiración, debido que Coq4p no cumple su función esencial como parte del complejo, y aquellos en los que la síntesis de CoQ₆ no se ve afectada pero, de alguna forma, Coq4p impide que funcione el complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial y, por tanto, también la respiración.

5. Organización de los complejos respiratorios en los mutantes en *COQ4*

Una de las funciones más importantes del CoQ es el transporte de electrones desde el complejo I y el complejo II hasta el complejo III. El complejo III a su vez los transfiere al citocromo *c* y este al complejo IV, el cual acaba cediéndole los electrones al oxígeno. Durante la transferencia de electrones los complejos I, III y IV bombean protones al espacio intermembrana generando un gradiente de protones entre ambos lados de la membrana interna. Dado que la membrana es impermeable al paso de protones estos pasan a través de la ATP sintetasa, que utiliza la energía por el paso de los protones para generar ATP a partir de ADP. Todo este proceso es lo que se conoce como fosforilación oxidativa.

El complejo I o NADH-ubiquinona oxidorreductasa toma dos electrones cedidos por el NADH y los cede a una molécula de CoQ reduciéndola. En esta reducción el CoQ toma dos H^+ de la matriz. La energía liberada por la transferencia de electrones permite el paso de 4 H^+ desde la matriz al espacio intermembrana. La levadura *S. cerevisiae* no presenta un complejo I como tal, sino que posee tres NADH deshidrogenasas de clase 2: dos están situadas en la cara externa de la membrana interna mitocondrial y utilizan el NADH citosólico procedente de la glucólisis (*NDE1* y *NDE2*), mientras que la otra está situada en la cara matricial de la membrana interna mitocondrial y utiliza el NADH procedente del ciclo de Krebs (*NDI1*) (Joseph-Horne et al., 2001). La principal diferencia de estas NADH deshidrogenasas con el complejo I es que el transporte de electrones no va acoplado a la transferencia de protones y, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, son insensibles a la rotenona y a la piericidina.

El complejo II o succinato-ubiquinona oxidorreductasa toma dos electrones provenientes del succinato y reduce una molécula de CoQ, que a su vez toma dos H^+ de la matriz. En este caso no se produce translocación de protones al espacio intermembrana.

El complejo III o ubiquinol-citocromo *c* oxidorreductasa utiliza los electrones cedidos por el ubiquinol para reducir dos moléculas de citocromo *c*. Como consecuencia dos

protones son translocados al espacio intermembrana. Al oxidarse, el ubiquinol libera también dos protones al espacio intermembrana, por lo que por cada molécula de ubiquinona que llega al complejo III, son translocados cuatro H^+ .

El CoQ cede los electrones al complejo III mediante el llamado ciclo del Q (Mitchell, 1975). El complejo III posee dos sitios de unión para la unión al CoQ (Q_0 y Q_1). El ciclo comienza con la unión de una molécula de ubiquinol (forma reducida) al sitio Q_0 y una molécula de ubiquinona (forma oxidada) al sitio Q_1 . El ubiquinol cede dos electrones: uno a un centro Fe-S que lo cede al citocromo *c*, reduciéndolo; el segundo electrón va, a través del citocromo *b*, a la molécula de ubiquinona del sitio Q_1 reduciéndola parcialmente a semiquinona. Al oxidarse esta primera molécula de ubiquinol dos protones pasan al espacio intermembrana. A continuación, una segunda molécula de ubiquinol se une al sitio Q_0 . Uno de los electrones de esta molécula reduce una segunda molécula de citocromo *c* y el otro reduce la semiquinona hasta ubiquinona, para lo cual toma dos protones de la matriz. La oxidación del ubiquinol hace que dos protones más pasen al espacio intermembrana. En resumen, por cada dos moléculas de ubiquinol oxidadas, se liberan 4 protones al espacio intermembrana y se reducen dos moléculas de citocromo *c* y una de ubiquinona.

El complejo IV o citocromo *c* oxidasa oxida el citocromo *c* para reducir oxígeno molecular. Son necesarias cuatro moléculas de citocromo *c* obtener dos moléculas de agua. En este proceso se produce la translocación de cuatro H^+ . Además se toman dos H^+ más de la matriz para la formación de las moléculas de agua.

El paso de protones al espacio intermembrana genera un gradiente electroquímico a ambos lados de la membrana mitocondrial. Gracias a este gradiente, el paso de protones a través de la ATP sintetasa (o complejo V) genera un cambio conformacional en el complejo que permite que la energía liberada sea utilizada para la generación de ATP a partir de ADP.

Existen diversas teorías sobre cómo se organizan los complejos respiratorios dentro de la membrana mitocondrial interna. Hay varios estudios que apoyan un modelo en el

que los complejos respiratorios fluyen de manera independiente dentro de la membrana mitocondrial (Hackenbrock et al., 1986) aunque otros autores apoyan la teoría de que los complejos respiratorios no se encuentran al azar en la membrana mitocondrial interna sino que se organizan formando complejos supramoleculares (Schägger and Pfeiffer, 2000). En *S. cerevisiae* el complejo citocromo c oxidasa (IV) está unido al complejo citocromo c reductasa (III) y lo hace de tres formas: como dímero libre (III_2) o como supercomplejo con uno o dos monómeros de complejo IV (III_2IV_1 o III_2IV_2). La proporción en la que se encuentran estas formas depende de las condiciones de crecimiento (Schägger and Pfeiffer, 2000). Recientemente, algunos autores tienden a pensar en un modelo intermedio dinámico (Acín-Pérez et al., 2008).

Además de actuar como donador de electrones, el CoQ podría tener una función estructural en el mantenimiento del complejo III. Se ha demostrado la inestabilidad del complejo III en levaduras incapaces de sintetizar CoQ₆ y su recuperación tras la incorporación de CoQ₆ exógeno a la mitocondria (Santos-Ocaña et al., 2002). Por otro lado, el complejo III posee dos sitios de unión a coenzima Q, Q₀ y Q₁, con el fin de estabilizar el radical semiquinona producido en el paso de los dos electrones del CoQ al citocromo c, que sólo puede aceptar uno. Se ha descrito la unión de dos moléculas de CoQ al sitio Q₀ y una molécula al sitio Q_i (Bartoschek et al., 2001). La existencia de estas tres moléculas de CoQ formando parte del complejo apoya la idea de una función estructural. Además es esencial para el bombeo de protones del complejo III (Darrouzet and Daldal, 2002).

Por otro lado, se ha especulado con la idea de algunos de las proteínas Coq también podrían tener algún tipo interacción con el complejo III que interviniera en su estabilidad ya que en los mutantes puntuales *Coq4-1* y *Coq4-2*, mediante BN-PAGE, se observa un patrón de bandas alterado en el caso del complejo III que no puede atribuirse a la falta de CoQ ya que en otros mutantes incapaces de sintetizar CoQ este efecto no se observa (Marbois et al., 2009).

Esta idea, junto con nuestros resultados en los que se observa que las mutaciones en Coq4p afectan a la actividad del complejo III, sugieren que esta proteína podría tener un papel fundamental en la estabilidad del complejo siendo necesaria para activarlo de algún modo. Para confirmar si Coq4p es necesaria para su estructura y la alteración en la estructura del complejo no se debe sólo a la falta de CoQ, analizamos mediante electroforesis BN-PAGE la organización de los complejos respiratorios en un mutante nulo *coq4* y en dos tipos de mutantes puntuales: *coq4-1*, que no produce CoQ₆ y los mutantes en fosforilación que, aunque contiene CoQ₆ tiene el complejo III afectado. Para ello se purificaron mitocondrias procedentes de levaduras con las distintas versiones de Coq4p y se solubilizaron utilizando digitonina como detergente para no alterar los complejos. Las muestras resultantes se sometieron a electroforesis en condiciones nativas y analizó el patrón de bandas mediante tinción con azul coomassie y tinción de plata.

Según los resultados obtenidos (Figura 33) podemos observar que las levaduras portadoras de mutaciones en *COQ4* presentan un patrón de bandas alterado si lo comparamos con una levadura silvestre o complementada con el gen silvestre. Sobre todo se ve afectado el complejo III₂IV₁ y el complejo V tanto en su forma dimérica como monomérica. Esto ocurre tanto en el mutante nulo y en el mutante puntual *coq4-1*, que no poseen CoQ₆, como en los demás mutantes que sí poseen CoQ₆. Por tanto, podemos decir que la ausencia de Coq4p en si, y no sólo la falta de CoQ₆, provoca una alteración en la organización de los complejos respiratorios. La alteración en el complejo III₂IV₁ podría ser debida a la ausencia de una proteína Coq4p que se una al complejo III y lo estabilice.

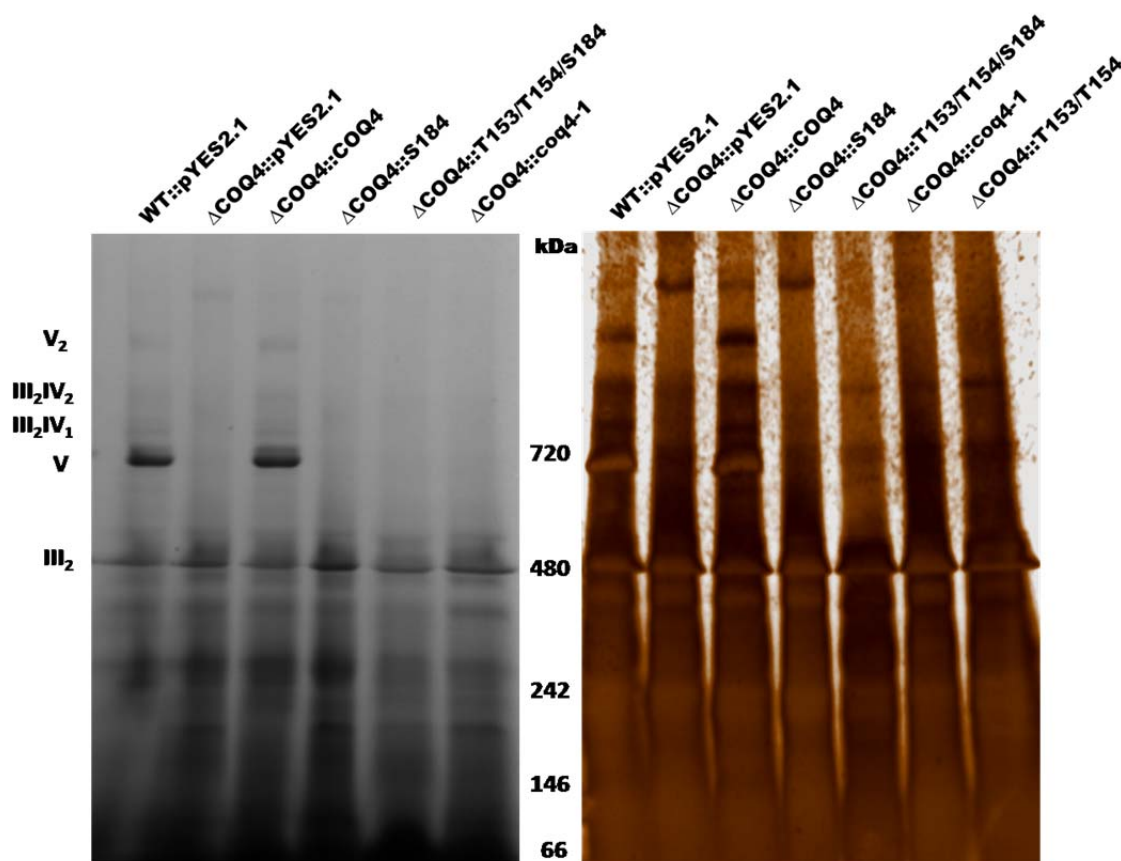


Figura 33. Análisis de los complejos respiratorios mediante electroforesis BN-PAGE. Mitocondrias solubilizadas con digitonina fueron sometidas a electroforesis en condiciones nativas para analizar la distribución de los complejos respiratorios. En la imagen de la izquierda aparece la tinción con azul coomassie y a la derecha la tinción con plata. Se observa que el los mutantes en *COQ4* el patrón de bandas se ve alterado respecto a la levadura silvestre (WT::pYES2.1).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La sobreexpresión de proteínas con el fin de suprimir la falta de otra es habitualmente utilizada para el estudio de complejos de proteínas. En la síntesis de CoQ₆ la sobreexpresión de Coq8p ha sido utilizada con frecuencia para rescatar la formación del complejo de síntesis en levaduras deficientes en CoQ₆ y ha ayudado a entender la función de algunas de estas proteínas (He et al., 2014; Ozeir et al., 2011; Padilla et al., 2009; Xie et al., 2012).

Además de utilizar Coq8p, parece interesante ver el efecto que produce la sobreexpresión de cada una de las proteínas Coq tanto en levaduras silvestre como en los distintos mutantes para la síntesis de CoQ₆. Tras llevar a cabo estos experimentos y teniendo en cuenta los resultados observados podemos diferenciar entre tres tipos de proteínas. Hay proteínas cuya sobreexpresión produce un efecto positivo en la síntesis tanto en la levadura silvestre como en el mutante nulo para esta misma proteína como es el caso de Coq4p y Coq7p. En ambos casos estas proteínas actuarían como factor limitante en la síntesis. Si tenemos en cuenta que Coq4p actúa como nucleadora este efecto positivo se debería a que un mayor número de moléculas de Coq4p permitiría la formación de un mayor número de complejos y se sintetizarían más moléculas de CoQ₆. En el caso de Coq7p la cantidad de esta proteína determina la conversión de DMQ₆ a CoQ₆ por lo que, a mayor cantidad de proteína, mayor contenido en CoQ₆. Por otra parte existen proteínas como Coq5p y Coq8p cuya sobreexpresión no afecta a una levadura silvestre pero en el caso de una levadura mutante para *coq5* y *coq8* respectivamente, el exceso de proteína provoca que no se sintetice CoQ₆. Este efecto negativo podría deberse a que el exceso de proteína interferiría en la formación del complejo provocando un complejo aberrante incapaz de sintetizar CoQ₆. En la levadura silvestre este efecto no se observa ya que existe un complejo previamente formado que no se ve afectado por la sobreexpresión. En el caso de Coq5p además se confirma su doble función enzimática y estructural. Por un lado, la sobreexpresión en los mutantes *coq5* y *coq7* ayuda al ensamblaje del complejo permitiendo que se forme y se acumule el sustrato de cada una de ambas enzimas. Sin embargo, en el caso del mutante *coq5* debería sintetizarse CoQ₆ ya que Coq5p está presente, pero sólo se

acumula DDMQ₆ por lo que el exceso de proteína afectaría a la actividad metiltransferasa. Con Coq9p sucede algo similar a lo que ocurre en el caso de Coq5p y Coq8p aunque la sobreexpresión en el mutante *coq9* sólo provoca una disminución de los niveles de CoQ₆. Por último, hay proteínas como Coq3p y Coq6p cuya sobreexpresión producen un efecto negativo en la síntesis de CoQ₆ tanto en la levadura silvestre como en los mutantes nulos posiblemente debido a que poseen una función enzimática y un exceso interfiere en la formación del complejo. Esta diversidad de efectos observada al sobreexpresar los distintos genes *COQ* indica que las distintas proteínas codificadas por estos genes, además de tener funciones distintas, actúan en distintos momentos de la síntesis.

Con lo que conocemos hasta el momento, podemos suponer que las proteínas Coq forman un complejo multienzimático y que Coq4p parece poseer una función nucleadora en la formación de este complejo uniéndose a un intermediario lipídico de la síntesis y permitiendo la unión del resto de proteínas hasta formar el complejo final de síntesis de CoQ. Sin embargo, todavía no sabemos con seguridad cual es la composición exacta de este complejo y como se forma. Dado que la fosforilación participa en la regulación de la síntesis de CoQ, no es extraño pensar que el inicio de la formación del complejo de síntesis esté también controlado mediante fosforilación. Todavía no se conoce el mecanismo por el cual se inicia la nucleación del complejo pero una posibilidad es que Coq4p sea una fosfoproteína y que sea la fosforilación la que active la unión de esta proteína a la cola isoprenoide de la molécula de HHB desencadenando la unión del resto de proteínas del complejo. El hecho de que la sobreexpresión de Coq8p, una presunta quinasa, permita el ensamblaje del complejo de síntesis en levaduras con mutaciones nulas de genes *COQ* apoya esta idea.

Para determinar si Coq4p es una fosfoproteína y qué aminoácidos pueden ser clave en la fosforilación se realizó un estudio mediante un programa informático que analiza la estructura secundaria de la proteína buscando residuos con alta probabilidad de ser fosforilados. Este tipo de herramientas ya habían sido utilizadas antes con éxito para encontrar fosfoaminoácidos en proteínas Coq como en el caso de Coq7p, en el que se caracterizaron tres sitios de fosforilación implicados en la regulación de la actividad de

la proteína (Martin-Montalvo et al., 2011). El análisis mostró que Coq4p presenta varios residuos susceptibles de ser fosforilados, algunos de ellos conservados en varias especies. Mediante un ensayo quinasa hemos determinado que Coq4p es una fosfoproteína, al menos *in vitro*, y que el cambio de estos fosfoaminoácidos a alanina disminuye el grado de fosforilación de esta proteína. La localización vecina de estos tres aminoácidos en un modelo tridimensional de la proteína en la superficie de la misma permite aventurar la existencia de un dominio de fosforilación. De todas formas, es necesario recordar que en el ensayo *in vitro* se añadió una quinasa como la PKC en exceso y pueden fosforilarse otros residuos de manera inespecífica que *in vivo* no serían fosforilados. Por otro lado, tampoco podemos descartar que la disminución en la fosforilación se deba a que el cambio de estos aminoácidos provoque un cambio conformacional de la proteína que afecte a otros residuos fosforilables que dejan de estar disponibles para ser fosforilados.

Otros mutantes puntuales han sido descritos en la proteína Coq4p (Marbois et al., 2009) y localizados en la estructura tridimensional de esta (Rea et al., 2010). Al localizar todas las mutaciones puntuales en la estructura de la proteína se observa que las anteriormente descritas se sitúan en una región distinta a la de este posible dominio de fosforilación. Teniendo esto en cuenta, la proteína Coq4p parece tener dos dominios, un primer dominio de unión al HHB y/o a otras proteínas Coq en el que participarían los residuos descritos por Marbois et al., y un dominio posiblemente regulador de la actividad de la proteína que es controlado por fosforilación. Por lo tanto, esto podría significar que existe un punto de regulación de la síntesis de CoQ mediante fosforilación en una etapa temprana como es el inicio de la formación del complejo de síntesis.

Mediante los experimentos llevados a cabo en las levaduras portadoras de las versiones modificadas en Coq4p podemos observar el efecto que estas versiones de la proteína producen *in vivo*. Hasta ahora, la única función conocida de Coq4p era la de participar como nucleadora en la formación del complejo de síntesis de CoQ₆ y todos los mutantes descritos hasta el momento presentaban el mismo fenotipo, no sintetizaban CoQ₆ y por lo tanto eran deficientes en la respiración (Belogrudov et al.,

2001; Marbois et al., 2009). Por ello, en principio, el hecho de que los mutantes en los presuntos sitios de fosforilación no crezcan en YPG parece normal. Sin embargo, estos mutantes presentan un fenotipo distinto, sintetizan CoQ₆ aunque siguen siendo deficientes en respiración. Este resultado es novedoso ya que implica que Coq4p podría poseer una función relacionada con la respiración mitocondrial independiente de la síntesis de CoQ. La deficiencia en la respiración se confirmó mediante la medida de consumo de oxígeno y se observó que, como era de esperar, estas levaduras mutantes no presentaban un consumo de oxígeno sensible a cianuro. Si la cantidad presente de CoQ no es un problema debemos preguntarnos por qué no son capaces de respirar. Estos mutantes carecen de actividad del complejo III y I+III. La actividad del complejo I es similar o incluso mayor que la de una levadura silvestre por lo que el problema parece estar en el complejo III, el encargado de tomar los electrones del CoQ y cederlos al citocromo c. La deficiencia en la actividad en el complejo III debida mutaciones en Coq4p podría explicarse debido a la falta de CoQ₆ ya que se ha observado la inestabilidad del complejo III en levaduras deficientes en síntesis de CoQ₆ y su recuperación tras la incorporación de CoQ₆ exógeno a la mitocondria (Santos-Ocaña et al., 2002). Sin embargo, estas levaduras presentan niveles normales o incluso mayores que los de una levadura silvestre por lo que es la falta de una proteína Coq4 totalmente funcional la que provoca defectos en la actividad del complejo III. Un caso similar en el que mutantes en un gen sintetizan CoQ pero no respiran es el de *COQ10* (Barros et al., 2005). Todo parece indicar que esta proteína es una proteína de unión a CoQ y es necesaria para transportarlo al sitio correcto donde puede ceder los electrones al complejo III, por lo que este complejo también se ve afectado en estos mutantes. Esto lleva a pensar que Coq4p podría tener una función parecida, es decir, ser la encargada de hacer disponible el CoQ al complejo III para que pueda cederle los electrones. Se ha llegado a sugerir una posible interacción entre estas dos proteínas ya que en el mutante *coq10* disminuyen los niveles de Coq4p (Barros et al., 2005). Antes de suponer que Coq4p sea necesaria para la disponibilidad del CoQ en la cadena respiratoria es necesario comprobar que realmente existe una cantidad suficiente de CoQ reducido que pueda ser utilizado por el complejo III. Los resultados obtenidos

indican que el ratio CoQ reducido/oxidado es incluso un poco mayor que en una levadura silvestre por lo que no debería constituir un problema.

La suplementación con CoQ₆ ha sido utilizada para rescatar la respiración en la mayoría de los mutantes en la síntesis de CoQ₆ (He et al., 2014; Padilla et al., 2009; Santos-Ocaña et al., 2002). A diferencia de lo que ocurre con otros mutantes, este rescate no se produce en ninguno de los mutantes *coq4*. La importación de CoQ exógeno a la mitocondria es dependiente de la estirpe (Santos-Ocaña et al., 2002), sin embargo, los resultados descartan que este sea el problema. De hecho, los mutantes en los supuestos sitios de fosforilación ya poseen CoQ₆. Por tanto, si las levaduras son capaces de sintetizar CoQ como si no, es necesaria la presencia de una proteína Coq4p funcional para que la cadena transportadora de electrones funcione correctamente.

La idea de que Coq4p posee dos funciones coincide con lo observado en el apartado 2 de resultados donde planteamos la posibilidad de la existencia de dos posibles dominios en la proteína. Por una parte, los aminoácidos mutados en las levaduras deficientes en CoQ₆ (Marbois et al., 2009) formarían parte de una región de la proteína implicada en la síntesis de CoQ con lo que las mutaciones impedirían la formación del complejo de síntesis. Estas mutaciones podrían afectar a la unión de Coq4p a la cola isoprenoide de la molécula de HHB, o a la unión de otras proteínas de este complejo haciendo que no se forme correctamente, o quizás simplemente el cambio de aminoácido provoca un cambio conformacional en la proteína que impide que sea funcional (Marbois et al., 2009). Uno de los aminoácidos mutados, E226K, forma parte del motivo de unión a zinc. La existencia de este dominio, como proponen los autores, podría servir como sensor del estado redox de la mitocondria e incluso que la mutación en este motivo podría ser la causa de que Coq3p no aparezca formando parte de complejos de alto peso molecular en este mutante.

Por otro lado, existiría otro dominio formado por los aminoácidos presuntamente fosforilables que son esenciales para la actividad del complejo III. En este caso es poco probable que este defecto se deba a que las mutaciones provocan un cambio conformacional de la proteína ya que ésta pudiese llevar a cabo su función nucleadora y la síntesis de CoQ₆ tiene lugar en estos mutantes. Una posibilidad es que estos

aminoácidos sean sitios de fosforilación y que a través de estos grupos fosfato interactúe con el complejo III. Esta interacción puede ser necesaria para que el complejo reciba el CoQ o bien para activarlo.

Utilizando la sobreexpresión de Coq8p podemos confirmar si existe o no un complejo de síntesis de CoQ₆ en cada uno de los mutantes. A la vista de los resultados, los mutantes deficientes en síntesis de CoQ₆ no poseen un complejo de síntesis mientras que los mutantes en los presuntos sitios de fosforilación, afectados sólo en la respiración, sí presentan este complejo. El hecho de que en los primeros mutantes no se forme complejo de síntesis al sobreexpresar Coq8p encaja con la idea de que Coq4p es esencial para su formación y no descarta que sea la diana de esta presunta quinasa. También podemos observar que la sobreexpresión en los mutantes deficientes sólo en respiración no es capaz de rescatar el crecimiento en YPG por lo que, al menos en lo que se refiere a interacción con el complejo III, Coq8p parece no estar relacionada con Coq4p o simplemente no interviene en este proceso.

Con respecto a la función de Coq4p relacionada directamente con la respiración, se analizó la organización de los complejos respiratorios en los distintos mutantes en *COQ4*. En todos los casos, la falta de una proteína Coq4p funcional dio lugar a un patrón de bandas alterado si lo comparamos con una levadura que porta el gen silvestre. Algunos autores han propuesto la interacción de algunos polipéptidos de la síntesis de CoQ con los supercomplejos respiratorios. Mediante BN-PAGE se ha observado una alteración en el patrón del complejo *bc₁* de *S. cerevisiae* en los mutantes *coq4-1* y *coq4-2*. Esta alteración no puede achacarse a la falta de CoQ debido a que no se observa en otros mutantes deficientes en CoQ (Marbois et al., 2009) aunque también puede deberse a las diferencias entre las distintas estirpes utilizadas para el estudio. Basándonos en esto podríamos pensar que Coq4p interactúa con el complejo III y lo estabiliza, quizás no directamente, sino que le proporciona el CoQ necesario para su estabilización.

Si tenemos en cuenta los resultados anteriores y todo lo que sabemos por la bibliografía podemos suponer un modelo del complejo de síntesis de CoQ₆. La primera molécula específica de la ruta de síntesis del CoQ es el HHB, sintetizado por Coq1p y

Coq2p. Estas dos proteínas no forman parte del complejo de síntesis. El HHB se acumula durante la fase de crecimiento exponencial cuando el metabolismo es fermentativo (Poon et al., 1995). Una vez sintetizado el HHB este podría unirse a Coq4p que actuaría como nucleadora. La unión de la cola isoprenoide del HHB a Coq4p no se ha comprobado experimentalmente, sólo podemos basarnos en el modelo tridimensional propuesto a partir de su homólogo en *Nostoc sp.* PCC7120 que co-cristalizó con una molécula de geranil-geranil monofosfato (Rea et al., 2010). A partir de esta unión de Coq4p al precursor, el resto de proteínas Coq se unirían para formar un complejo de 700 kDa que llamaremos precomplejo. Hay indicios de que algunas de las proteínas Coq podrían estar reguladas por fosforilación. La fosforilación de Coq4p podría ser el paso activador de la nucleación o tal vez algunas proteínas como Coq3p o Coq5p necesitarían ser fosforiladas en este momento para poder unirse al precomplejo o ser activadas. Todavía no sabemos si Coq8p es una quinasa o si es la responsable de la fosforilación de estas proteínas, aunque se ha observado que de alguna forma interviene en la fosforilación de alguna de ellas (Tauche et al., 2008). Además, los estudios de sobreexpresión realizados hasta ahora indican que la acción de Coq8p favorece la síntesis de CoQ₆ por lo que podría tener un papel fundamental en esta etapa de la síntesis. Esta fase de nucleación podría coincidir con el paso de las células a fase post-diáuxica. La composición de este precomplejo todavía no se conoce, sin embargo, podemos pensar que Coq7p no forma parte de él o al menos está inactivo, ya que en esta fase de cambio de metabolismo se produce la acumulación de DMQ₆, el sustrato de esta proteína (Padilla et al., 2009). Actualmente sabemos que Coq7p es activada mediante desfosforilación por la fosfatasa Ptc7p (Martin-Montalvo et al., 2013). Es en este punto donde esta fosfatasa actuaría activando a Coq7p. Una vez activa, Coq7p se uniría al precomplejo dando lugar al complejo final de 1,3 MDa que tomaría al DMQ₆ y lo transformaría en CoQ₆.

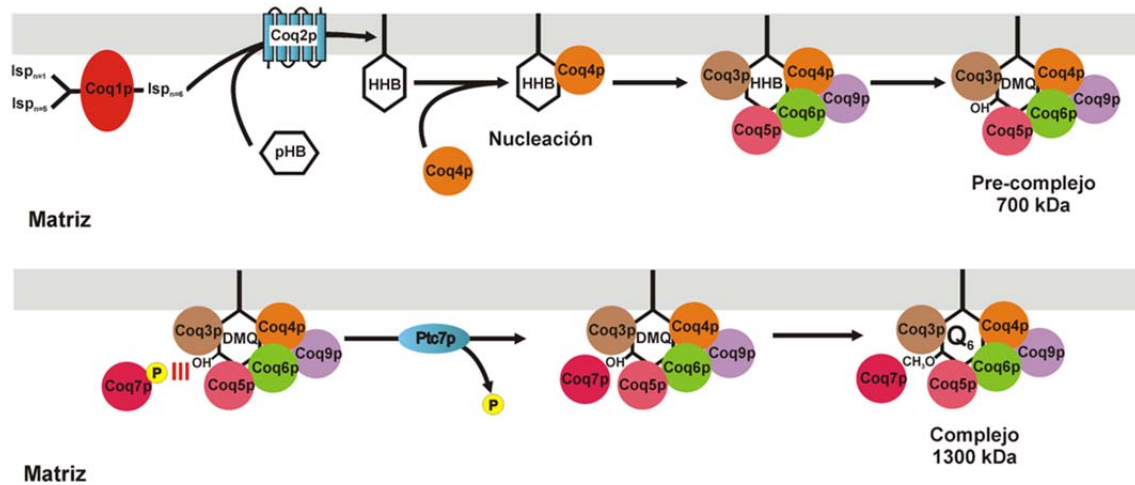


Figura 34. Esquema de la formación del complejo de la síntesis de CoQ₆ en *S. cerevisiae*.

Una vez sintetizado el CoQ₆ este es reducido por el complejo I y II y ahora debe ceder los electrones al complejo III. Es en este punto donde vuelve a actuar Coq4p, bien haciendo disponible el CoQ para que pueda llegar al complejo III, o bien activándolo a través de su interacción directa con algún componente de este complejo. Esta nueva función supondría un punto de control en el que Coq4p le indicaría al complejo III que la síntesis de CoQ funciona correctamente, que hay CoQ disponible y que este puede ser reducido. Todo esto parece indicar que Coq4p participaría como punto de integración entre la actividad de la cadena transportadora de electrones y la síntesis de CoQ₆.

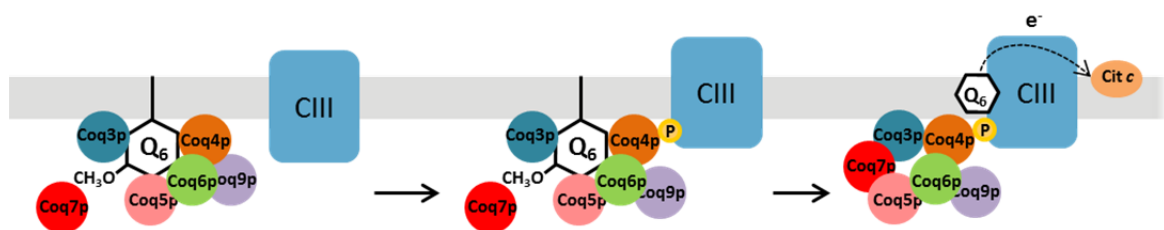


Figura 35. Modelo de regulación de la actividad del complejo III a través de la proteína Coq4.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los estudios de sobreexpresión de los genes *COQ* apoyan la existencia de un complejo de síntesis regulado por fosforilación al menos en alguno de sus componentes.
2. La sobreexpresión de *COQ4* provoca un aumento en los niveles de CoQ tanto en la levadura silvestre como en el mutante *coq4*, lo cual apoya la función nucleadora de Coq4p.
3. Las treoninas 153 y 154 y la serina 184 son posibles fosfoaminoácidos.
4. Los fosfoaminoácidos se agrupan en la superficie de la proteína Coq4 formando un posible dominio de fosforilación.
5. Coq4p se fosforila *in vitro* por una PKC.
6. La modificación de T153, T154 y S184 a alanina reduce el grado de fosforilación *in vitro* de Coq4p.
7. La expresión de las versiones modificadas de Coq4p provoca una deficiencia en la respiración mitocondrial como consecuencia de una disminución casi total de la actividad del complejo III.
8. La expresión de las versiones modificadas de Coq4p no afecta a la síntesis de CoQ.
9. La sobreexpresión de *COQ10* en los mutantes en *COQ4* sugiere que estas dos proteínas no interaccionan.
10. Coq4p posee una doble función en el metabolismo mitocondrial, podría actuar nucleando el ensamblaje del complejo de síntesis de CoQ y es requerido para mantener la actividad del complejo III.
11. . La ausencia de Coq4p o la expresión de versiones que producen deficiencia de CoQ o versiones no fosforilables en T153, T154 y S184 producen una desorganización de los complejos respiratorios.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abdulrehman, D., Monteiro, P.T., Teixeira, M.C., Mira, N.P., Lourenço, A.B., dos Santos, S.C., Cabrito, T.R., Francisco, A.P., Madeira, S.C., Aires, R.S., et al. (2011). YEASTRACT: providing a programmatic access to curated transcriptional regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae* through a web services interface. *Nucleic Acids Res.* 39, D136–40.

Acin-Perez, R., Salazar, E., Kamenetsky, M., Buck, J., Levin, L.R.L.R., and Manfredi, G. (2009). Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* 9, 265–276.

Acin-Perez, R., Gatti, D.L., Bai, Y., and Manfredi, G. (2011). Protein phosphorylation and prevention of cytochrome oxidase inhibition by ATP: coupled mechanisms of energy metabolism regulation. *Cell Metab.* 13, 712–719.

Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M.L., Pérez-Martos, A., and Enriquez, J.A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol. Cell* 32, 529–539.

Aeby, A., Sznajer, Y., Cavé, H., Rebuffat, E., Van Coster, R., Rigal, O., and Van Bogaert, P. (2007). Cardiorespiratory (CFC) syndrome associated with muscular coenzyme Q10 deficiency. *J. Inher. Metab. Dis.* 30, 827.

Amoutzias, G.D., He, Y., Lilley, K.S., Van de Peer, Y., and Oliver, S.G. (2012). Evaluation and properties of the budding yeast phosphoproteome. *Mol. Cell. Proteomics* 11, M111.009555.

Arroyo, A., Rodríguez-Aguilera, J.C., Santos-Ocaña, C., Villalba, J.M., and Navas, P. (2004). Stabilization of extracellular ascorbate mediated by coenzyme Q transmembrane electron transport. *Methods Enzymol.* 378, 207–217.

Artuch, R., Brea-Calvo, G., Briones, P., Aracil, A., Galván, M., Espinós, C., Corral, J., Volpini, V., Ribes, A., Andreu, A.L., et al. (2006). Cerebellar ataxia with coenzyme Q10 deficiency: diagnosis and follow-up after coenzyme Q10 supplementation. *J. Neurol. Sci.* 246, 153–158.

Ashby, M.N., and Edwards, P.A. (1990). Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants. Characterization of the structural gene encoding hexaprenyl pyrophosphate synthetase. *J. Biol. Chem.* 265, 13157–13164.

Ashby, M.N., Kutsunai, S.Y., Ackerman, S., Tzagoloff, A., and Edwards, P.A. (1992). COQ2 is a candidate for the structural gene encoding para-hydroxybenzoate:polyprenyltransferase. *J. Biol. Chem.* 267, 4128–4136.

- Ashraf, S., Gee, H.Y., Woerner, S., Xie, L.X., Vega-Warner, V., Lovric, S., Fang, H., Song, X., Cattran, D.C., Avila-Casado, C., et al. (2013). ADCK4 mutations promote steroid-resistant nephrotic syndrome through CoQ10 biosynthesis disruption. *J. Clin. Invest.* 123, 5179–5189.
- Baba, S.W., Belogradov, G.I., Lee, J.C., Lee, P.T., Strahan, J., Shepherd, J.N., and Clarke, C.F. (2004). Yeast Coq5 C-Methyltransferase Is Required for Stability of Other Polypeptides Involved in Coenzyme Q Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 279, 10052–10059.
- Barkovich, R.J., Shtanko, a., Shepherd, J.A., Lee, P.T., Myles, D.C., Tzagoloff, A., and Clarke, C.F. (1997). Characterization of the COQ5 Gene from *Saccharomyces cerevisiae*. EVIDENCE FOR A C-METHYLTRANSFERASE IN UBIQUINONE BIOSYNTHESIS. *J. Biol. Chem.* 272, 9182–9188.
- Barros, M.H., Johnson, A., Gin, P., Marbois, B.N., Clarke, C.F., and Tzagoloff, A. (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* COQ10 Gene Encodes a START Domain Protein Required for Function of Coenzyme Q in Respiration. *J. Biol. Chem.* 280, 42627–42635.
- Barroso, M.P., Gómez-Díaz, C., Villalba, J.M., Burón, M.I., López-Lluch, G., and Navas, P. (1997). Plasma membrane ubiquinone controls ceramide production and prevents cell death induced by serum withdrawal. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29, 259–267.
- Bartoschek, S., Johansson, M., Geierstanger, B.H., Okun, J.G., Lancaster, C.R., Humpfer, E., Yu, L., Yu, C.A., Griesinger, C., and Brandt, U. (2001). Three molecules of ubiquinone bind specifically to mitochondrial cytochrome bc1 complex. *J. Biol. Chem.* 276, 35231–35234.
- Belogradov, G.I., Lee, P.T., Jonassen, T., Hsu, A.Y., Gin, P., and Clarke, C.F. (2001). Yeast COQ4 Encodes a Mitochondrial Protein Required for Coenzyme Q Synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 392, 48–58.
- Bentinger, M., Dallner, G., Chojnacki, T., and Swiezewska, E. (2003). Distribution and breakdown of labeled coenzyme Q10 in rat. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 563–575.
- Bentinger, M., Brismar, K., and Dallner, G. (2007). The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion* 7 *Suppl*, S41–50.
- Bentinger, M., Tekle, M., and Dallner, G. (2010). Coenzyme Q - Biosynthesis and functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 74–79.
- Bernardi, P., and Di Lisa, F. (2014). The mitochondrial permeability transition pore: Molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J. Mol. Cell. Cardiol.*
- Berry, D.B., and Gasch, A.P. (2008). Stress-activated Genomic Expression Changes Serve a Preparative Role for Impending Stress in Yeast. *19*, 4580–4587.

- Brea-Calvo, G., Rodríguez-Hernández, A., Fernández-Ayala, D.J.M., Navas, P., and Sánchez-Alcázar, J.A. (2006). Chemotherapy induces an increase in coenzyme Q10 levels in cancer cell lines. *Free Radic. Biol. Med.* *40*, 1293–1302.
- Brea-Calvo, G., Siendones, E., Sánchez-Alcázar, J.A., de Cabo, R., and Navas, P. (2009). Cell Survival from Chemotherapy Depends on NFκB Transcriptional Up-Regulation of Coenzyme Q Biosynthesis. *PLoS One* *4*, e5301.
- Brinkworth, R.I., Munn, A.L., and Kobe, B. (2006). Protein kinases associated with the yeast phosphoproteome. *BMC Bioinformatics* *7*, 47.
- Campbell, J.S., Seger, R., Graves, J.D., Graves, L.M., Jensen, A.M., and Krebs, E.G. (1995). The MAP kinase cascade. *Recent Prog. Horm. Res.* *50*, 131–159.
- Casarin, A., Jimenez-Ortega, J.C., Trevisson, E., Pertegato, V., Doimo, M., Ferrero-Gomez, M.L., Abbadi, S., Artuch, R., Quinzii, C., Hirano, M., et al. (2008). Functional characterization of human COQ4, a gene required for Coenzyme Q10 biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *372*, 35–39.
- De Castro, E., Sigrist, C.J.A., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P.S., Gasteiger, E., Bairoch, A., and Hulo, N. (2006). ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res.* *34*, W362–5.
- Chevtzoff, C., Yoboue, E.D., Galinier, A., Casteilla, L., Daignan-Fornier, B., Rigoulet, M., and Devin, A. (2010). Reactive oxygen species-mediated regulation of mitochondrial biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *285*, 1733–1742.
- Christianson, T.W., Sikorski, R.S., Dante, M., Shero, J.H., and Hieter, P. (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* *110*, 119–122.
- Clarke, C.F., Williams, W., and Teruya, J.H. (1991). Ubiquinone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and sequence of COQ3, the 3,4-dihydroxy-5-hexaprenylbenzoate methyltransferase gene. *J. Biol. Chem.* *266*, 16636–16644.
- Colquhoun, A., and Schumacher, R.I. (2001). gamma-Linolenic acid and eicosapentaenoic acid induce modifications in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species generation, lipid peroxidation and apoptosis in Walker 256 rat carcinosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta* *1533*, 207–219.
- Cramer, W.A., Hasan, S.S., and Yamashita, E. (2011). The Q cycle of cytochrome bc complexes: a structure perspective. *Biochim. Biophys. Acta* *1807*, 788–802.
- Crane, F.L., Hatefi, Y., Lester, R.L., and Widmer, C. (1957). Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* *25*, 220–221.

Cui, T.Z., and Kawamukai, M. (2009). Coq10, a mitochondrial coenzyme Q binding protein, is required for proper respiration in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS J.* 276, 748–759.

Darrouzet, E., and Daldal, F. (2002). Movement of the iron-sulfur subunit beyond the ef loop of cytochrome b is required for multiple turnovers of the bc1 complex but not for single turnover Qo site catalysis. *J. Biol. Chem.* 277, 3471–3476.

Dejean, L., Beauvoit, B., Alonso, A.-P., Bunoust, O., Guérin, B., and Rigoulet, M. (2002). cAMP-induced modulation of the growth yield of *Saccharomyces cerevisiae* during respiratory and respiro-fermentative metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1554, 159–169.

Diomedi-Camassei, F., Di Giandomenico, S., Santorelli, F.M., Caridi, G., Piemonte, F., Montini, G., Ghiggeri, G.M., Murer, L., Barisoni, L., Pastore, A., et al. (2007). COQ2 nephropathy: a newly described inherited mitochondriopathy with primary renal involvement. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 2773–2780.

Do, T.Q., Schultz, J.R., and Clarke, C.F. (1996). Enhanced sensitivity of ubiquinone-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* to products of autoxidized polyunsaturated fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 7534–7539.

Do, T.Q., Hsu, a Y., Jonassen, T., Lee, P.T., and Clarke, C.F. (2001). A defect in coenzyme Q biosynthesis is responsible for the respiratory deficiency in *Saccharomyces cerevisiae* abc1 mutants. *J. Biol. Chem.* 276, 18161–18168.

Duncan, A.J., Bitner-Glindzicz, M., Meunier, B., Costello, H., Hargreaves, I.P., López, L.C., Hirano, M., Quinzii, C.M., Sadowski, M.I., Hardy, J., et al. (2009). A Nonsense Mutation in COQ9 Causes Autosomal-Recessive Neonatal-Onset Primary Coenzyme Q10 Deficiency: A Potentially Treatable Form of Mitochondrial Disease. *Am. J. Hum. Genet.* 84, 558–566.

Eastmond, D.L., and Nelson, H.C.M. (2006). Genome-wide analysis reveals new roles for the activation domains of the *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor (Hsf1) during the transient heat shock response. *J. Biol. Chem.* 281, 32909–32921.

Echtay, K.S., Winkler, E., and Klingenberg, M. (2000). Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature* 408, 609–613.

Emmanuele, V., López, L.C., López, L., Berardo, A., Naini, A., Tadesse, S., Wen, B., D’Agostino, E., Solomon, M., DiMauro, S., et al. (2012). Heterogeneity of coenzyme Q10 deficiency: patient study and literature review. *Arch. Neurol.* 69, 978–983.

- Fernández-Ayala, D.J., Martín, S.F., Barroso, M.P., Gómez-Díaz, C., Villalba, J.M., Rodríguez-Aguilera, J.C., López-Lluch, G., and Navas, P. (2000). Coenzyme Q protects cells against serum withdrawal-induced apoptosis by inhibition of ceramide release and caspase-3 activation. *Antioxid. Redox Signal.* 2, 263–275.
- Fernández-Ayala, D.J.M., Brea-Calvo, G., López-Lluch, G., and Navas, P. (2005). Coenzyme Q distribution in HL-60 human cells depends on the endomembrane system. *Biochim. Biophys. Acta* 1713, 129–137.
- Fernández-Ayala, D.J.M., Guerra, I., Jiménez-Gancedo, S., Cascajo, M. V, Gavilán, A., Dimauro, S., Hirano, M., Briones, P., Artuch, R., De Cabo, R., et al. (2013). Survival transcriptome in the coenzyme Q10 deficiency syndrome is acquired by epigenetic modifications: a modelling study for human coenzyme Q10 deficiencies. *BMJ Open* 3, e002524–.
- Festenstein, G.N., Heaton, F.W., Lowe, J.S., and Morton, R.A. (1955). A constituent of the unsaponifiable portion of animal tissue lipids (λ max. 272 m μ). *Biochem. J.* 59, 558–566.
- Forsgren, M., Attersand, A., Lake, S., Grünler, J., Swiezewska, E., Dallner, G., and Climent, I. (2004). Isolation and functional expression of human COQ2, a gene encoding a polyprenyl transferase involved in the synthesis of CoQ. *Biochem. J.* 382, 519–526.
- Gancedo, J.M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 334–361.
- Gempel, K., Topaloglu, H., Talim, B., Schneiderat, P., Schoser, B.G.H., Hans, V.H., Pálmafy, B., Kale, G., Tokatli, A., Quinzii, C., et al. (2007). The myopathic form of coenzyme Q10 deficiency is caused by mutations in the electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase (ETF DH) gene. *Brain* 130, 2037–2044.
- Gey, U., Czupalla, C., Hoflack, B., Rödel, G., and Krause-Buchholz, U. (2008). Yeast pyruvate dehydrogenase complex is regulated by a concerted activity of two kinases and two phosphatases. *J. Biol. Chem.* 283, 9759–9767.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K., and Weissman, J.S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737–741.
- Gibson, F., and Young, I.G. (1978). Isolation and characterization of intermediates in ubiquinone biosynthesis. *Methods Enzymol.* 53, 600–609.
- Gille, L., and Nohl, H. (2000). The existence of a lysosomal redox chain and the role of ubiquinone. *Arch. Biochem. Biophys.* 375, 347–354.

Gin, P., and Clarke, C.F. (2005). Genetic Evidence for a Multi-subunit Complex in Coenzyme Q Biosynthesis in Yeast and the Role of the Coq1 Hexaprenyl Diphosphate Synthase. *J. Biol. Chem.* **280**, 2676–2681.

Gómez-Díaz, C., Rodríguez-Aguilera, J.C., Barroso, M.P., Villalba, J.M., Navarro, F., Crane, F.L., and Navas, P. (1997). Antioxidant ascorbate is stabilized by NADH-coenzyme Q10 reductase in the plasma membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**, 251–257.

Gorman, A., McGowan, A., and Cotter, T.G. (1997). Role of peroxide and superoxide anion during tumour cell apoptosis. *FEBS Lett.* **404**, 27–33.

Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G.J., Voss, D., and Hegemann, J.H. (2002). A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **30**, e23.

Hackenbrock, C.R., Chazotte, B., and Gupte, S.S. (1986). The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J. Bioenerg. Biomembr.* **18**, 331–368.

Hagerman, R.A., and Willis, R.A. (2002). The yeast gene COQ5 is differentially regulated by Mig1p, Rtg3p and Hap2p. *Biochim. Biophys. Acta* **1578**, 51–58.

Hagerman, R.A., Trotter, P.J., and Willis, R.A. (2002). The regulation of COQ5 gene expression by energy source. *Free Radic. Res.* **36**, 485–490.

Hamilton, S.J., Chew, G.T., and Watts, G.F. (2007). Therapeutic regulation of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Diab. Vasc. Dis. Res.* **4**, 89–102.

Harbison, C.T., Gordon, D.B., Lee, T.I., Rinaldi, N.J., Macisaac, K.D., Danford, T.W., Hannett, N.M., Tagne, J.-B., Reynolds, D.B., Yoo, J., et al. (2004). Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* **431**, 99–104.

He, C.H., Xie, L.X., Allan, C.M., Tran, U.C., and Clarke, C.F. (2014). Coenzyme Q supplementation or over-expression of the yeast Coq8 putative kinase stabilizes multi-subunit Coq polypeptide complexes in yeast coq null mutants. *Biochim. Biophys. Acta.*

Heeringa, S.F., Chernin, G., Chaki, M., Zhou, W., Sloan, A.J., Ji, Z., Xie, L.X., Salviati, L., Hurd, T.W., Vega-Warner, V., et al. (2011). COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. *J. Clin. Invest.* **121**, 2013–2024.

Hers, H.G. (1976). The control of glycogen metabolism in the liver. *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 167–189.

Hickman, M.J., and Winston, F. (2007). Heme levels switch the function of Hap1 of *Saccharomyces cerevisiae* between transcriptional activator and transcriptional repressor. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7414–7424.

- Horvath, R., Schneiderat, P., Schoser, B.G.H., Gempel, K., Neuen-Jacob, E., Plöger, H., Müller-Höcker, J., Pongratz, D.E., Naini, A., DiMauro, S., et al. (2006). Coenzyme Q10 deficiency and isolated myopathy. *Neurology* 66, 253–255.
- Hsieh, E.J., Gin, P., Gulmezian, M., Tran, U.C., Saiki, R., Marbois, B.N., and Clarke, C.F. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* Coq9 polypeptide is a subunit of the mitochondrial coenzyme Q biosynthetic complex. *Arch. Biochem. Biophys.* 463, 19–26.
- Hsu, A.Y., Poon, W.W., Shepherd, J.A., Myles, D.C., and Clarke, C.F. (1996). Complementation of coq3 mutant yeast by mitochondrial targeting of the *Escherichia coli* UbiG polypeptide: evidence that UbiG catalyzes both O-methylation steps in ubiquinone biosynthesis. *Biochemistry* 35, 9797–9806.
- Hsu, A.Y., Do, T.Q., Lee, P.T., and Clarke, C.F. (2000). Genetic evidence for a multi-subunit complex in the O-methyltransferase steps of coenzyme Q biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1484, 287–297.
- Hüttemann, M., Lee, I., Samavati, L., Yu, H., and Doan, J.W. (2007). Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 1701–1720.
- Jakobs, B.S., van den Heuvel, L.P., Smeets, R.J.P., de Vries, M.C., Hien, S., Schaible, T., Smeitink, J.A.M., Wevers, R.A., Wortmann, S.B., and Rodenburg, R.J.T. (2013). A novel mutation in COQ2 leading to fatal infantile multisystem disease. *J. Neurol. Sci.* 326, 24–28.
- Jiménez-Hidalgo, M., Santos-Ocaña, C., Padilla, S., Villalba, J.M., López-Lluch, G., Martín-Montalvo, A., Minor, R.K., Sinclair, D.A., de Cabo, R., and Navas, P. (2009). NQR1 controls lifespan by regulating the promotion of respiratory metabolism in yeast. *Aging Cell* 8, 140–151.
- Jimenez-Ortega, J.C. (2009). Complementación genómico-funcional del gen COQ4 humano en levadura como modelo de diagnóstico molecular en enfermedades que cursan con deficiencia primaria de coenzima Q. Tesis Doctoral. Universidad Pablo de Olavide 2009.
- Johnson, A., Gin, P., Marbois, B.N., Hsieh, E.J., Wu, M., Barros, M.H., Clarke, C.F., and Tzagoloff, A. (2005). COQ9, a New Gene Required for the Biosynthesis of Coenzyme Q in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 280, 31397–31404.
- Jonassen, T., and Clarke, C.F. (2000). Isolation and functional expression of human COQ3, a gene encoding a methyltransferase required for ubiquinone biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 275, 12381–12387.
- Jones, M.E. (1980). Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 49, 253–279.

Joseph-Horne, T., Hollomon, D.W., and Wood, P.M. (2001). Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim. Biophys. Acta* **1504**, 179–195.

Kagan, V.E., Arroyo, A., Tyurin, V.A., Tyurina, Y.Y., Villalba, J.M., and Navas, P. (1998). Plasma membrane NADH-coenzyme Q0 reductase generates semiquinone radicals and recycles vitamin E homologue in a superoxide-dependent reaction. *FEBS Lett.* **428**, 43–46.

Kalén, A., Appelkvist, E.L., Chojnacki, T., and Dallner, G. (1990). Nonaprenyl-4-hydroxybenzoate transferase, an enzyme involved in ubiquinone biosynthesis, in the endoplasmic reticulum-Golgi system of rat liver. *J. Biol. Chem.* **265**, 1158–1164.

Kanshin, E., Michnick, S.W., and Thibault, P. (2013). Displacement of N/Q-rich peptides on TiO₂ beads enhances the depth and coverage of yeast phosphoproteome analyses. *J. Proteome Res.* **12**, 2905–2913.

Keogh, M.J., and Chinnery, P.F. (2013). How to spot mitochondrial disease in adults. *Clin. Med.* **13**, 87–92.

Klingenberg, M., and Echay, K.S. (2001). Uncoupling proteins: the issues from a biochemist point of view. *Biochim. Biophys. Acta* **1504**, 128–143.

Knoell, H.-E. (1979). Isolation of a soluble enzyme complex comprising the ubiquinone-8 synthesis apparatus from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**, 919–925.

Lagier-Tourenne, C., Tazir, M., López, L.C., Quinzii, C.M., Assoum, M., Drouot, N., Busso, C., Makri, S., Ali-Pacha, L., Benhassine, T., et al. (2008). ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 661–672.

Lai, L., Kosorukoff, A.L., Burke, P. V., and Kwast, K.E. (2005). Dynamical remodeling of the transcriptome during short-term anaerobiosis in *Saccharomyces cerevisiae*: differential response and role of Msn2 and/or Msn4 and other factors in galactose and glucose media. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 4075–4091.

Lalani, S.R., Vladutiu, G.D., Plunkett, K., Lotze, T.E., Adesina, A.M., and Scaglia, F. (2005). Isolated mitochondrial myopathy associated with muscle coenzyme Q10 deficiency. *Arch. Neurol.* **62**, 317–320.

Lange, B.M., Rujan, T., Martin, W., and Croteau, R. (2000). Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13172–13177.

Laredj, L.N., Licitra, F., and Puccio, H.M. (2014). The molecular genetics of coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochimie* **100C**, 78–87.

- Larsson, C., Pålman, I.L., Ansell, R., Rigoulet, M., Adler, L., and Gustafsson, L. (1998). The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 347–357.
- Lee, I., Salomon, A.R., Ficarro, S., Mathes, I., Lottspeich, F., Grossman, L.I., and Hüttemann, M. (2005). cAMP-dependent tyrosine phosphorylation of subunit I inhibits cytochrome c oxidase activity. *J. Biol. Chem.* 280, 6094–6100.
- Lee, P.T., Hsu, A.Y., Ha, H.T., and Clarke, C.F. (1997). A C-methyltransferase involved in both ubiquinone and menaquinone biosynthesis: isolation and identification of the *Escherichia coli* ubiE gene. *J. Bacteriol.* 179, 1748–1754.
- Leonard, C.J., Aravind, L., and Koonin, E. V (1998). Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the “eukaryotic” protein kinase superfamily. *Genome Res.* 8, 1038–1047.
- Littarru, G.P., and Langsjoen, P. (2007). Coenzyme Q10 and statins: biochemical and clinical implications. *Mitochondrion* 7 Suppl, S168–74.
- López, L.C., Schuelke, M., Quinzii, C.M., Kanki, T., Rodenburg, R.J.T., Naini, A., Dimauro, S., and Hirano, M. (2006). Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 1125–1129.
- Marbois, B.N., and Clarke, C.F. (1996). The COQ7 Gene Encodes a Protein in *Saccharomyces cerevisiae* Necessary for Ubiquinone Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 271, 2995–3004.
- Marbois, B., Gin, P., Faull, K.F., Poon, W.W., Lee, P.T., Strahan, J., Shepherd, J.N., and Clarke, C.F. (2005). Coq3 and Coq4 define a polypeptide complex in yeast mitochondria for the biosynthesis of coenzyme Q. *J. Biol. Chem.* 280, 20231–20238.
- Marbois, B., Gin, P., Gulmezian, M., and Clarke, C.F. (2009). The yeast Coq4 polypeptide organizes a mitochondrial protein complex essential for coenzyme Q biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1791, 69–75.
- Marbois, B., Xie, L.X., Choi, S., Hirano, K., Hyman, K., and Clarke, C.F. (2010). para-Aminobenzoic Acid Is a Precursor in Coenzyme Q6 Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 285, 27827–27838.
- Martín, H., Flández, M., Nombela, C., and Molina, M. (2005). Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. *Mol. Microbiol.* 58, 6–16.
- Martin-Montalvo, A., Gonzalez-Mariscal, I., Padilla, S., Ballesteros, M., Brautigan, D.L., Navas, P.P., Santos-Ocaña, C., Martín-Montalvo, A., and González-Mariscal, I. (2011a). Respiratory-induced coenzyme Q biosynthesis is regulated by a phosphorylation cycle of Cat5p/Coq7p. *Biochem. J.* 440, 107–114.

Martin-Montalvo, A., Gonzalez-Mariscal, I., Padilla, S., Ballesteros, M., Brautigan, D.L., Navas, P., and Santos-Ocaña, C. (2011b). Respiratory-induced coenzyme Q biosynthesis is regulated by a phosphorylation cycle of Cat5p/Coq7p. *Biochem. J.* **440**, 107–114.

Martin-Montalvo, A., Gonzalez-Mariscal, I., Pomares-Viciano, T., Padilla-Lopez, S., Ballesteros, M., Vazquez-Fonseca, L., Gandolfo, P., Brautigan, D.L., Navas, P., and Santos-Ocana, C. (2013). The phosphatase Ptc7 induces coenzyme Q biosynthesis by activating the hydroxylase Coq7 in yeast. *J. Biol. Chem.*

Matsuoka, T., Maeda, H., Goto, Y., and Nonaka, I. (1991). Muscle coenzyme Q10 in mitochondrial encephalomyopathies. *Neuromuscul. Disord.* **1**, 443–447.

Meganathan, R. (2001). Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**, 131–139.

Milne, D.M., Palmer, R.H., and Meek, D.W. (1992). Mutation of the casein kinase II phosphorylation site abolishes the anti-proliferative activity of p53. *Nucleic Acids Res.* **20**, 5565–5570.

Mitchell, P. (1975). Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS Lett.* **56**, 1–6.

Mollet, J., Giurgea, I., Schlemmer, D., Dallner, G., Chretien, D., Delahodde, A., Bacq, D., de Lonlay, P., Munnich, A., and Rötig, A. (2007). Prenyldiphosphate synthase, subunit 1 (PDSS1) and OH-benzoate polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone deficiency and oxidative phosphorylation disorders. *J. Clin. Invest.* **117**, 765–772.

Mollet, J., Delahodde, A., Serre, V., Chretien, D., Schlemmer, D., Lombes, A., Boddaert, N., Desguerre, I., de Lonlay, P., de Baulny, H.O., et al. (2008). CABC1 gene mutations cause ubiquinone deficiency with cerebellar ataxia and seizures. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 623–630.

Monteiro, P.T., Mendes, N.D., Teixeira, M.C., d'Orey, S., Tenreiro, S., Mira, N.P., Pais, H., Francisco, A.P., Carvalho, A.M., Lourenço, A.B., et al. (2008). YEASTRACT-DISCOVERER: new tools to improve the analysis of transcriptional regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **36**, D132–6.

Montero, R., Pineda, M., Aracil, A., Vilaseca, M.-A., Briones, P., Sánchez-Alcázar, J.-A., Navas, P., and Artuch, R. (2007). Clinical, biochemical and molecular aspects of cerebellar ataxia and Coenzyme Q10 deficiency. *Cerebellum* **6**, 118–122.

Montero, R., Sánchez-Alcázar, J.A., Briones, P., Hernández, A.R., Cordero, M.D., Trevisson, E., Salvati, L., Pineda, M., García-Cazorla, A., Navas, P., et al. (2008). Analysis of coenzyme Q10 in muscle and fibroblasts for the diagnosis of CoQ10 deficiency syndromes. *Clin. Biochem.* **41**, 697–700.

- Montero, R., Grazina, M., López-Gallardo, E., Montoya, J., Briones, P., Navarro-Sastre, A., Land, J.M., Hargreaves, I.P., and Artuch, R. (2013). Coenzyme Q₁₀ deficiency in mitochondrial DNA depletion syndromes. *Mitochondrion* 13, 337–341.
- Mortensen, S.A., Rosenfeldt, F., Kumar, A., Dolliner, P., Filipiak, K.J., Pella, D., Alehagen, U., Steurer, G., and Littarru, G.P. (2014). The Effect of Coenzyme Q10 on Morbidity and Mortality in Chronic Heart Failure: Results From Q-SYMBIO: A Randomized Double-Blind Trial. *JACC. Heart Fail.*
- Moxley, J.F., Jewett, M.C., Antoniewicz, M.R., Villas-Boas, S.G., Alper, H., Wheeler, R.T., Tong, L., Hinnebusch, A.G., Ideker, T., Nielsen, J., et al. (2009). Linking high-resolution metabolic flux phenotypes and transcriptional regulation in yeast modulated by the global regulator Gcn4p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 6477–6482.
- Mugoni, V., Postel, R., Catanzaro, V., De Luca, E., Turco, E., Digilio, G., Silengo, L., Murphy, M.P., Medana, C., Stainier, D.Y.R., et al. (2013). Ubiad1 Is an Antioxidant Enzyme that Regulates eNOS Activity by CoQ10 Synthesis. *Cell* 152, 504–518.
- Murai, M., Matsunobu, K., Kudo, S., Ifuku, K., Kawamukai, M., and Miyoshi, H. (2014). Identification of the Binding Site of the Quinone-Head Group in Mitochondrial Coq10 by Photoaffinity Labeling. *Biochemistry*.
- Musumeci, O., Naini, A., Slonim, A.E., Skavin, N., Hadjigeorgiou, G.L., Krawiecki, N., Weissman, B.M., Tsao, C.Y., Mendell, J.R., Shanske, S., et al. (2001). Familial cerebellar ataxia with muscle coenzyme Q10 deficiency. *Neurology* 56, 849–855.
- Navas, P. (2014). Coenzyme Q10 Deficiency. *Mol. Syndromol.* 5.
- Nguyen, T.P.T., Casarin, A., Desbats, M.A., Doimo, M., Trevisson, E., Santos-Ocaña, C., Navas, P., Clarke, C.F., and Salviati, L. (2014). Molecular characterization of the human COQ5 C-methyltransferase in Coenzyme Q10 biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 1628–1638.
- Ogasahara, S., Engel, A.G., Frens, D., and Mack, D. (1989). Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 2379–2382.
- Oliveira, R., and Lucas, C. (2004). Expression studies of GUP1 and GUP2, genes involved in glycerol active transport in *Saccharomyces cerevisiae*, using semi-quantitative RT-PCR. *Curr. Genet.* 46, 140–146.
- Olsen, R.K.J., Andresen, B.S., Christensen, E., Bross, P., Skovby, F., and Gregersen, N. (2003). Clear relationship between ETF/ETFDH genotype and phenotype in patients with multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency. *Hum. Mutat.* 22, 12–23.

- Ozeir, M., Mühlenhoff, U., Webert, H., Lill, R., Fontecave, M., and Pierrel, F. (2011). Coenzyme Q Biosynthesis: Coq6 Is Required for the C5-Hydroxylation Reaction and Substrate Analogs Rescue Coq6 Deficiency. *Chem. & Biol.* 18, 1134–1142.
- Padilla, S., Jonassen, T., Jiménez-Hidalgo, M.A., Fernández-Ayala, D.J.M., López-Lluch, G., Marbois, B., Navas, P., Clarke, C.F., and Santos-Ocaña, C. (2004). Demethoxy-Q, an intermediate of coenzyme Q biosynthesis, fails to support respiration in *Saccharomyces cerevisiae* and lacks antioxidant activity. *J. Biol. Chem.* 279, 25995–26004.
- Padilla, S., Tran, U.C., Jiménez-Hidalgo, M., López-Martín, J.M., Martín-Montalvo, A., Clarke, C.F., Navas, P., and Santos-Ocaña, C. (2009). Hydroxylation of demethoxy-Q6 constitutes a control point in yeast coenzyme Q6 biosynthesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 173–186.
- Padilla-López, S., Jiménez-Hidalgo, M., Martín-Montalvo, A., Clarke, C.F., Navas, P., and Santos-Ocaña, C. (2009). Genetic evidence for the requirement of the endocytic pathway in the uptake of coenzyme Q6 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 1238–1248.
- Papa, S., Sardanelli, A.M., Cocco, T., Speranza, F., Scacco, S.C., and Technikova-Dobrova, Z. (1996). The nuclear-encoded 18 kDa (IP) AQDQ subunit of bovine heart complex I is phosphorylated by the mitochondrial cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* 379, 299–301.
- Pedruzzi, I., Bürckert, N., Egger, P., and De Virgilio, C. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* Ras/cAMP pathway controls post-diauxic shift element-dependent transcription through the zinc finger protein Gis1. *EMBO J.* 19, 2569–2579.
- Pierrel, F., Hamelin, O., Douki, T., Kieffer-Jaquinod, S., Mühlenhoff, U., Ozeir, M., Lill, R., and Fontecave, M. (2010). Involvement of Mitochondrial Ferredoxin and Para-Aminobenzoic Acid in Yeast Coenzyme Q Biosynthesis. *Chem. Biol.* 17, 449–459.
- Pineda, M., Montero, R., Aracil, A., O’Callaghan, M.M., Mas, A., Espinos, C., Martínez-Rubio, D., Palau, F., Navas, P., Briones, P., et al. (2010). Coenzyme Q(10)-responsive ataxia: 2-year-treatment follow-up. *Mov. Disord.* 25, 1262–1268.
- Pocsfalvi, G., Cuccurullo, M., Schlosser, G., Scacco, S., Papa, S., and Malorni, A. (2007). Phosphorylation of B14.5a subunit from bovine heart complex I identified by titanium dioxide selective enrichment and shotgun proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 231–237.
- Poon, W.W., Marbois, B.N., Faul, K.F., Clarke, C.F., and Faull, K.F. (1995). 3-Hexaprenyl-4-hydroxybenzoic acid forms a predominant intermediate pool in ubiquinone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* 320, 305–314.

- Poon, W.W., Do, T.Q., Marbois, B.N., and Clarke, C.F. (1997). Sensitivity to treatment with polyunsaturated fatty acids is a general characteristic of the ubiquinone-deficient yeast coq mutants. *Mol. Aspects Med.* 18 Suppl, S121–7.
- Poon, W.W., Barkovich, R.J., Hsu, A.Y., Frankel, A., Lee, P.T., Shepherd, J.N., Myles, D.C., and Clarke, C.F. (1999). Yeast and rat Coq3 and Escherichia coli UbiG polypeptides catalyze both O-methyltransferase steps in coenzyme Q biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 274, 21665–21672.
- Quinzii, C.M., and Hirano, M. (2010). Coenzyme Q and mitochondrial disease. *Dev. Disabil. Res. Rev.* 16, 183–188.
- Quinzii, C.M., and Hirano, M. (2011). Primary and secondary CoQ(10) deficiencies in humans. *Biofactors* 37, 361–365.
- Quinzii, C., Naini, A., Salviati, L., Trevisson, E., Navas, P., Dimauro, S., and Hirano, M. (2006). A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 345–349.
- Quinzii, C.M., Emmanuele, V., and Hirano, M. (2014). Clinical presentations of coenzyme q10 deficiency syndrome. *Mol. Syndromol.* 5, 141–146.
- De Rasmio, D., Panelli, D., Sardanelli, A.M., and Papa, S. (2008). cAMP-dependent protein kinase regulates the mitochondrial import of the nuclear encoded NDUFS4 subunit of complex I. *Cell. Signal.* 20, 989–997.
- Rea, S.L., Graham, B.H., Nakamaru-Ogiso, E., Kar, A., and Falk, M.J. (2010). Bacteria, yeast, worms, and flies: Exploiting simple model organisms to investigate human mitochondrial diseases. *Dev. Disabil. Res. Rev.* 16, 200–218.
- Reinders, J., Wagner, K., Zahedi, R.P., Stojanovski, D., Eyrich, B., van der Laan, M., Rehling, P., Sickmann, A., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2007). Profiling phosphoproteins of yeast mitochondria reveals a role of phosphorylation in assembly of the ATP synthase. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 1896–1906.
- Rodríguez-Hernández, A., Cordero, M.D., Salviati, L., Artuch, R., Pineda, M., Briones, P., Gómez Izquierdo, L., Cotán, D., Navas, P., and Sánchez-Alcázar, J.A. (2009). Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy. *Autophagy* 5, 19–32.
- Rötig, A., Appelkvist, E.L., Geromel, V., Chretien, D., Kadhon, N., Edery, P., Lebedeau, M., Dallner, G., Munnich, A., Ernster, L., et al. (2000). Quinone-responsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q10 deficiency. *Lancet* 356, 391–395.
- Rugarli, E.I., and Langer, T. (2012). Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. *EMBO J.* 31, 1336–1349.

- Saito, H., and Posas, F. (2012). Response to hyperosmotic stress. *Genetics* 192, 289–318.
- Salviati, L., Sacconi, S., Murer, L., Zacchello, G., Franceschini, L., Laverda, A.M., Basso, G., Quinzii, C., Angelini, C., Hirano, M., et al. (2005). Infantile encephalomyopathy and nephropathy with CoQ10 deficiency: a CoQ10-responsive condition. *Neurology* 65, 606–608.
- Salviati, L., Trevisson, E., Rodriguez Hernandez, M.A., Casarin, A., Pertegato, V., Doimo, M., Cassina, M., Agosto, C., Desbats, M.A., Sartori, G., et al. (2012). Haploinsufficiency of COQ4 causes coenzyme Q10 deficiency. *J. Med. Genet.* 49, 187–191.
- Santos-Ocaña, C., Navas, P., Crane, F.L., and Córdoba, F. (1995). Extracellular ascorbate stabilization as a result of transplasma electron transfer in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27, 597–603.
- Santos-Ocaña, C., Villalba, J.M., Córdoba, F., Padilla, S., Crane, F.L., Clarke, C.F., and Navas, P. (1998). Genetic evidence for coenzyme Q requirement in plasma membrane electron transport. *J. Bioenerg. Biomembr.* 30, 465–475.
- Santos-Ocaña, C., Do, T.Q., Padilla, S., Navas, P., and Clarke, C.F. (2002). Uptake of exogenous coenzyme Q and transport to mitochondria is required for bc1 complex stability in yeast coq mutants. *J. Biol. Chem.* 277, 10973–10981.
- Schaefer, A.M., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., and Chinnery, P.F. (2004). The epidemiology of mitochondrial disorders--past, present and future. *Biochim. Biophys. Acta* 1659, 115–120.
- Schägger, H., and Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19, 1777–1783.
- Schmelzer, C., Lindner, I., Vock, C., Fujii, K., and Döring, F. (2007). Functional connections and pathways of coenzyme Q10-inducible genes: an in-silico study. *IUBMB Life* 59, 628–633.
- Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19–27.
- Sippel, C.J., Goewert, R.R., Slachman, F.N., and Olson, R.E. (1983). The regulation of ubiquinone-6 biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 258, 1057–1061.
- Staschke, K.A., Dey, S., Zaborske, J.M., Palam, L.R., McClintick, J.N., Pan, T., Edenberg, H.J., and Wek, R.C. (2010). Integration of general amino acid control and target of rapamycin (TOR) regulatory pathways in nitrogen assimilation in yeast. *J. Biol. Chem.* 285, 16893–16911.

Steenaaart, N.A., and Shore, G.C. (1997). Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit IV is phosphorylated by an endogenous kinase. *FEBS Lett.* **415**, 294–298.

Tauche, A., Krause-Buchholz, U., and Rödel, G. (2008). Ubiquinone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the molecular organization of O-methylase Coq3p depends on Abc1p/Coq8p. *FEMS Yeast Res.* **8**, 1263–1275.

Thomas, S.R., Neuzil, J., and Stocker, R. (1996). Cosupplementation with coenzyme Q prevents the prooxidant effect of alpha-tocopherol and increases the resistance of LDL to transition metal-dependent oxidation initiation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 687–696.

Thomson, M. (2002). Evidence of undiscovered cell regulatory mechanisms: phosphoproteins and protein kinases in mitochondria. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 213–219.

Thorsen, M., Lagniel, G., Kristiansson, E., Junot, C., Nerman, O., Labarre, J., and Tamás, M.J. (2007). Quantitative transcriptome, proteome, and sulfur metabolite profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* response to arsenite. *Physiol. Genomics* **30**, 35–43.

Tran, U.C., and Clarke, C.F. (2007a). Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes. *Mitochondrion* **7 Suppl**, S62–71.

Tran, U.C., Marbois, B., Gin, P., Gulmezian, M., Jonassen, T., and Clarke, C.F. (2006). Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* coq7 Mutants by Mitochondrial Targeting of the *Escherichia coli* UbiF Polypeptide. *J. Biol. Chem.* **281**, 16401–16409.

Turunen, M., Wehlin, L., Sjöberg, M., Lundahl, J., Dallner, G., Brismar, K., and Sindelar, P.J. (2002). beta2-Integrin and lipid modifications indicate a non-antioxidant mechanism for the anti-atherogenic effect of dietary coenzyme Q10. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**, 255–260.

Turunen, M., Olsson, J., and Dallner, G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1660**, 171–199.

Vajo, Z., King, L.M., Jonassen, T., Wilkin, D.J., Ho, N., Munnich, A., Clarke, C.F., and Francomano, C.A. (1999). Conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene clk-1 from yeast to human: a gene required for ubiquinone biosynthesis with potential implications for aging. *Mamm. Genome* **10**, 1000–1004.

Vázquez-Fonseca, L. (2013). Papel del gen ADCK2 en la regulación de la síntesis de coenzima Q. De lo clínico a lo molecular. Tesis doctoral. Universidad Pablo de Olavide 2013

Villalba, J.M., Navarro, F., Córdoba, F., Serrano, A., Arroyo, A., Crane, F.L., and Navas, P. (1995). Coenzyme Q reductase from liver plasma membrane: purification and role in trans-plasma-membrane electron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 4887–4891.

Walter, L., Nogueira, V., Leverve, X., Heitz, M.P., Bernardi, P., and Fontaine, E. (2000). Three classes of ubiquinone analogs regulate the mitochondrial permeability transition pore through a common site. *J. Biol. Chem.* 275, 29521–29527.

Watmough, N.J., and Frerman, F.E. (2010). The electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 1910–1916.

Xie, L.X., Hsieh, E.J., Watanabe, S., Allan, C.M., Chen, J.Y., Tran, U.C., and Clarke, C.F. (2011). Expression of the human atypical kinase ADCK3 rescues coenzyme Q biosynthesis and phosphorylation of Coq polypeptides in yeast coq8 mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 1811, 348–360.

Xie, L.X., Ozeir, M., Tang, J.Y., Chen, J.Y., Kieffer-Jaquinod, S., Fontecave, M., Clarke, C.F., and Pierrel, F. (2012). Over-expression of the Coq8 kinase in *Saccharomyces cerevisiae* coq null mutants allows for accumulation of diagnostic intermediates of the Coenzyme Q6 biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* 1–23.

Xue, Y., Ren, J., Gao, X., Jin, C., Wen, L., and Yao, X. (2008). GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol. Cell. Proteomics* 7, 1598–1608.

Yubero, D., Montero, R., Artuch, R., Land, J.M., Heales, S.J.R., and Hargreaves, I.P. (2014). Biochemical diagnosis of coenzyme q10 deficiency. *Mol. Syndromol.* 5, 147–155.

Zampol, M.A., Busso, C., Gomes, F., Ferreira-Junior, J.R., Tzagoloff, A., and Barros, M.H. (2010). Over-expression of COQ10 in *Saccharomyces cerevisiae* inhibits mitochondrial respiration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402, 82–87.

Zhang, J., Frerman, F.E., and Kim, J.-J.P. (2006). Structure of electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase and electron transfer to the mitochondrial ubiquinone pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 16212–16217.